


**POLYPEPTIDE DERIVED FROM VARIANT HEPATITIS B VIRUS, GENE
ENCODING THE SAME, AND RELATED DNA****Publication number:** WO9527788**Publication date:** 1995-10-19**Inventor:** UCHIDA TOSHIKAZU (JP); SHIKATA TOSHIO (JP)**Applicant:** DAINABOT CO LTD (JP); UCHIDA TOSHIKAZU (JP);
SHIKATA TOSHIO (JP)**Classification:****- international:** C07K14/02; C12N15/51; G01N33/576; A61K38/00;
C07K14/005; C12N15/51; G01N33/576; A61K38/00;
(IPC1-7): C12N15/51; C07K14/02; G01N33/569**- european:** C07K14/02; G01N33/576B**Application number:** WO1995JP00700 19950410**Priority number(s):** JP19940095458 19940411**Cited documents:** W 09429483**Report a data error here****Abstract of WO9527788**

The invention provides a novel hepatitis virus that cannot be detected by any of the type A, B, C, D and E virus tests, determines the gene sequence thereof, and provides a means for developing an effective method of detection and diagnosis thereof. The sequencing of a polypeptide derived from the above-identified novel variant hepatitis B virus and a gene encoding the same is conducted by amplifying the nucleic acid obtained from the serum of a patient with hepatitis according to the polymerase chain reaction. Also found is a polypeptide encoded by the antisense sequence DNA of a gene derived from the X region of the HBV. The polypeptide has 161 amino acid residues. The X protein as a product of X genes of the HBV is known to be not only useful as an antigen for detecting HBV infection but also capable of activating transcription by the trans-action thereof on the enhancer of the HBV itself or the enhancer of the promoter sequence of another cell gene through the interaction with cell factors in normal liver cells. Therefore attention is paid to the participation of this protein in liver cancer. A polypeptide containing the whole or part of the amino acid sequence encoded by the antisense sequence DNA derived from the X region of the above novel HBV is thought to be useful in the development of a hepatitis virus detection system and the development of efficacious antiviral and antitumor drugs through the development of a transcription activity detection system.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12N 15/51, C07K 14/02, G01N 33/569	A1	(11) 国際公開番号 WO95/27788 (43) 国際公開日 1995年10月19日(19.10.95)
(21) 国際出願番号 PCT/JP95/00700 (22) 国際出願日 1995年4月10日(10.04.95) (30) 優先権データ 特願平6/95458 1994年4月11日(11.04.94) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) ダイナボット株式会社(DAINABOT CO., LTD.)(JP/JP) 〒105 東京都港区虎ノ門3丁目8番21号 第33森ビル Tokyo, (JP) (71) 出願人: および (72) 発明者 内田俊和(UCHIDA, Toshikazu)(JP/JP) 〒173 東京都板橋区大山金井町16-8-216 Tokyo, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 志方俊夫(SHIKATA, Toshio)(JP/JP) 〒272 千葉県市川市本北方1丁目17番2号 Chiba, (JP) (74) 代理人 弁理士 水野昭宣(MIZUNO, Akinobu) 〒150 東京都渋谷区渋谷1丁目10番7号 グローリア宮益坂Ⅲ 305 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 JP, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title : POLYPEPTIDE DERIVED FROM VARIANT HEPATITIS B VIRUS, GENE ENCODING THE SAME, AND RELATED DNA (54) 発明の名称 変異B型肝炎ウイルス由来のポリペプチド、それをコードする遺伝子及びその関連DNA (57) Abstract The invention provides a novel hepatitis virus that cannot be detected by any of the type A, B, C, D and E virus tests, determines the gene sequence thereof, and provides a means for developing an effective method of detection and diagnosis thereof. The sequencing of a polypeptide derived from the above-identified novel variant hepatitis B virus and a gene encoding the same is conducted by amplifying the nucleic acid obtained from the serum of a patient with hepatitis according to the polymerase chain reaction. Also found is a polypeptide encoded by the antisense sequence DNA of a gene derived from the X region of the HBV. The polypeptide has 161 amino acid residues. The X protein as a product of X genes of the HBV is known to be not only useful as an antigen for detecting HBV infection but also capable of activating transcription by the trans-action thereof on the enhancer of the HBV itself or the enhancer of the promoter sequence of another cell gene through the interaction with cell factors in normal liver cells. Therefore attention is paid to the participation of this protein in liver cancer. A polypeptide containing the whole or part of the amino acid sequence encoded by the antisense sequence DNA derived from the X region of the above novel HBV is thought to be useful in the development of a hepatitis virus detection system and the development of efficacious antiviral and antitumor drugs through the development of a transcription activity detection system.		

(57) 要約

A型、B型、C型、D型及びE型のいずれの測定法でも検知できない新規な肝炎ウイルスを見出し、その遺伝子配列を決定するとともにその有効な検出診断法を開発する手段を提供する。この新規に変異B型肝炎ウイルスと同定され、そのHBV由来のポリペプチド及びそれをコードする遺伝子は、肝炎患者血清から得られた核酸をPCR法で増幅させることにより配列決定され、HBVのX領域由来の遺伝子のアンチセンス配列DNAによりコードされるポリペプチドが見出された。該ポリペプチドは、161個のアミノ酸残基を持つ。HBVのX遺伝子の産物であるX蛋白は、HBVに感染したことを検出するための抗原としての有用性があるのみならず、正常肝細胞中で細胞因子との相互作用を介してHBV自身のエンハンサーあるいは他の細胞遺伝子のエンハンサーやプロモーター配列にトランスに作用し、転写を活性化することなどの知見が得られていることから、肝臓への関与が注目されている。該新規なHBVのX領域由来のアンチセンス配列DNAでコードされるアミノ酸配列の全てあるいは一部を含むポリペプチドは、肝炎ウイルス検出系を開発したり、転写活性検出系を開発しての有効な抗ウイルス剤や抗腫瘍剤の開発においても有用と考えられる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
AT	オーストリア	ES	スペイン	LR	リベリア	SD	スーダン
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア共和国
BFG	ブルキナ・ファソ	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BG	ブルガリア	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	ML	マリ	TD	チャド
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TG	トゴ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	TJ	タジキスタン
CAF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MW	マラウイ	TM	トルクメニスタン
CCG	コンゴ	IT	イタリア	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	JP	日本	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NO	ノルウェー	US	米国
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン共和国
CZ	チェコ共和国	KR	大韓民国	PL	ポーランド	VN	ベトナム
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	RO	ルーマニア		

明 細 書

変異B型肝炎ウイルス由来のポリペプチド、それを
コードする遺伝子及びその関連DNA

産業上の利用分野

- 5 本発明は、新規なB型肝炎ウイルス（以下、「HBV」と略す。）由来のポリペプチド及びそれをコードする遺伝子に関し、より詳細には変異HBVのX領域由来の遺伝子のアンチセンス配列DNA、その変異配列及び部分断片、またはそれらから遺伝子工学的に誘導されたDNA配列、該アンチセンス配列を持つ遺伝子由来蛋白またはその一部のポリペプチド、さらにはそれらをコードする遺伝子、及びそれらの遺伝子を含有する断片に関する。本発明は、該遺伝子由来の蛋白またはその一部のポリペプチド及びそれに対する特異抗体を利用した変異HBV感染の検出測定診断にも関する。本発明は、一面では肝炎、肝癌、肝炎ウイルスなどの検出・診断薬、予防・治療剤などあるいはそれらの開発手段にも
- 10
- 15 関する。

背景技術

- ヒトの肝炎ウイルスは、現在までにA型、B型、C型、D型及びE型が発見されており、それぞれの血清学的診断方法もそれぞれ確立されている。すなわち、1970年代半ばにはA型肝炎ウイルス（HAV）及びB型肝炎ウイルス（HBV）の感染を検出する特異的な診断技術が、
- 20 1980年代半ばにはD型肝炎ウイルス（HDV）、1980年代後半にC型肝炎ウイルス（HCV）及びE型肝炎ウイルス（HEV）の感染を検出する特異的な診断技術が開発され、現在では輸血後肝炎やこれら

の感染キャリアーからの垂直感染または水平感染による散発性肝炎は世界各地で激減させることに成功している実情がある。日本においては、D型とE型肝炎ウイルス感染患者はほとんど存在せず、もっぱらA型、B型及びC型肝炎ウイルスが全肝炎患者の99.9%の原因となっており、HAV、HBV及びHCV感染の検出診断方法の恩恵によって患者数を大きく減少させることができている。しかしながら、依然として散発性肝炎の約20%、輸血後肝炎の約2%がHAV、HBV及びHCV感染の検出診断方法で陰性の原因不明の肝炎として、ヒト社会の中に存在し問題となっている。今のところその感染病態からこの原因不明の肝炎はウイルスによる伝播と考えられている（内科、69（6）、1167-1159, 1992）。現在、HBV感染の検出診断は、主にHB表面抗原（HBs-Ag）とHBコア抗体（HBc-Ab）の検出によって決定されているが、この他に、HB表面抗体（HBs-Ab）、HBe抗原（HBe-Ag）及びHBe抗体（HBe-Ab）の検出も実施されており、これらの検出系の総合的な実施によりHBVの感染が判定されている。こうして、これらHBVに関する5種類のHBV感染検出診断方法と、HAV及びHCV感染検出診断方法とで陰性と判定された場合、原因不明のウイルス肝炎と診断される。また、もしHBVあるいはHCV感染と判明した場合、インターフェロン等による治療を受けることが可能となるが、原因不明の場合はそのような治療は受けられない。また、肝炎患者のみならず既知のこれら肝炎ウイルス感染検出方法で検出できない肝炎ウイルスを保持している健常人（キャリアー）が存在した場合には、適切な検出診断方法がないと何らかの方法で無差別に他の人に感染させてしまうことがある。例えば、HBVで行われるワクチンやHBVイムノグロブリンによる感染予防や治療、献血血液の血清診断方法の結果による廃棄等による肝炎ウイルス蔓延の予防が、原因不

明の肝炎ウイルスに対して行われ得ないことからこのようなことが起こるのが現状である。

これらの既存のHAV、HBV及びHCV感染の検出診断方法で判定できない肝炎ウイルスの原因として、未知のF型肝炎ウイルスやG型肝炎ウイルスの存在を示唆する報告（臨床医、18（5）、624-625、1992）もある。また、変異しており既存のHCV検出診断方法では検出できないHCVの存在が報告（下遠野ら、プロシーディングスオブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス ユー・エス・エイ（Proc. Natl. Acad. Sci. USA）、87、9524-9528、1990；高見沢ら、ジャーナル オブ ビロロジ（Journal of Virology）、65（3）、1105-1113、1991）されているが、このような例ですべての原因不明の肝炎について説明できない。

ところでHBVの変異株についても多数の報告例があり、例えば、ウィリアム エフ カーマン（William F. Carman）らは、HBV表面抗原（HBs-Ag）由来のワクチンを投与されてHBs抗体（HBs-Ab）が誘導されたにもかかわらず、HBsの145番目のアミノ酸がGlyからArgに変異したHBVに感染した例を報告している（ザ ランセット（The Lancet）、336、325-329、1990）。また、小俣らは、HBVプレコア領域の変異によりHBV感染が劇症化する例を報告している（日本臨床、51（2）、29-33、1993）。さらにエハタ（Ehata）らは、慢性化したHBV感染患者から分離されるHBVのコア蛋白の変異のアミノ酸配列を報告している（ジャーナル オブ クリニカル インベスティゲーション（Journal of Clinical Investigation）、89、332-338、1992）。しかしながら、

これらのHBVの変異ウイルスはいずれも既知のHBV感染検出診断方法でHBV感染と判定できるものであることから、上記した原因不明の肝炎について説明できない。HBVの遺伝子は一部が一本鎖の環状二本鎖DNAからなるものであることが解明されており、P領域、S領域、
5 C領域及びX領域という4種の蛋白コード可能領域が知られている。X領域がコードしている蛋白はX蛋白とされている。ところが、HBVのX蛋白は、154個のアミノ酸残基よりなるもので、HBVに感染した初期の患者血清中にこのX蛋白に対する抗体が検出されることが確認されている以外は、そのものの詳細はまだよくわかっていない。最近になってX蛋白をコードする遺伝子と肝臓との関わりが示唆されるようになり、注目を集めるようになってきたが、その検出系や診断系は未だ確立
10 されていないのが現状である。

このように、既存の肝炎ウイルス感染検出診断方法で検出されない肝炎ウイルスに対してはターゲットが不明なため有効な抗ウイルス剤やワクチンの開発が行われていない。同様に、これらのウイルスに対する有効な診断薬も開発されていない。従って既存の肝炎ウイルス感染検出診断方法で検出されない肝炎ウイルス感染患者は、その治療方法の有効な
15 選択がなされない場合がある。また、既存の肝炎ウイルス感染検出診断方法で検出されない肝炎ウイルスキャリアーと接触する可能性がある人では、感染防止の観点でのワクチン等の有効な予防方法を実行できない場合がある。さらに、既存の肝炎ウイルス感染検出診断方法で検出されない肝炎ウイルスに汚染された血液等も有効な方法でチェックすることができず、処分しないまま利用して、他の人へのウイルス感染・伝播の原因となりかねない。

発明の開示

本発明者らは、既存の肝炎ウイルス感染検出診断方法で検出されない肝炎ウイルス感染患者やキャリアーの診断、治療及び予防法の開発を目的として、これまで発見されたウイルスとは異なる性質のウイルス遺伝子を取得し、いままで開発されてきた診断系とは異なる性格の、特にいままで検出できなかった範囲、あるいはこれまでより高率に肝炎ウイルス感染を検出できる新規な診断方法の開発のため、また、いままで開発されたHBVワクチンより優れた免疫獲得能を有するワクチンの開発のため、さらにはこれまでより優れた抗ウイルス剤を開発するための評価系の開発のため、鋭意研究してきた結果、新規なHBV由来遺伝子を見出し、それを取得するに至った。そして更なる研究の結果、本発明を完成させた。

即ち、本発明者らは、先に新規なB型肝炎ウイルス遺伝子のX領域に相当するDNA配列によりコードされる新規なポリペプチド及びそれをコードする遺伝子を見出したが、さらに新規な変異B型肝炎ウイルス遺伝子のX領域に相当する遺伝子のアンチセンス配列DNAによっても、新規なポリペプチドがコードされていることを見出し、そのポリペプチドあるいはその部分断片を利用すれば、HBVに感染したことを検出するための抗原としての有用性があるのみならず、正常肝細胞中で細胞因子との相互作用を介してHBV自身のエンハンサーあるいは他の細胞遺伝子のエンハンサーやプロモーター配列にトランスに作用し、転写を活性化することなどの肝臓への関与についての研究においても有用性があり、抗ウイルス剤、抗腫瘍剤として有用あるいはそれらの開発に役立つとの認識に至った。

本発明の新規なHBVのX領域遺伝子のアンチセンス配列DNA由来の蛋白、その全てあるいは一部を含むポリペプチドは、新規なHBVの

X領域遺伝子に特異的な領域と考えられ、これらの蛋白やポリペプチドを用いた肝炎ウイルス検出系を開発すれば、既存の肝炎ウイルス感染検出診断方法で陰性として検出できなかった肝炎陽性とすべき患者を検出することが可能となり、診断剤として有用であると考えられる。さらに
5 これらのポリペプチド自体及びそれをコードする遺伝子、さらにはそれらを遺伝子工学的に操作可能に含有するDNA配列は、新たな転写活性検出系の開発においても、有効な手段を提供し、抗ウイルス剤、抗癌剤などの開発においても有用と考えられる。

本発明の要旨は、配列表の配列番号1及び2に示す塩基配列で示される変異B型肝炎ウイルス遺伝子のX領域由来のアンチセンス配列DNA、
10 実質的にそれと同等な性状の変異配列、それらの部分断片、またはそれらから遺伝子工学的に誘導されたDNA配列、該アンチセンス配列を持つ遺伝子由来の蛋白やポリペプチド、実質的にそれと同等な性状の変異体、それらの部分断片、さらにはそれらをコードする遺伝子、及びそれ
15 らの遺伝子を含有する断片に存する。本発明の要旨は、該遺伝子由来の蛋白またはその一部のポリペプチド及びそれに対する特異抗体を利用した変異HBV感染の検出測定診断手段にも存する。

発明の詳細な説明

本発明の新規な遺伝子のX領域由来のアンチセンス配列DNA及びそれに関連したDNA配列、例えば、それを有効利用するうえで必須の配列の一部は、配列表の配列番号1及び2に示すものから選ばれたもの、
20 もしくはその全てあるいは一部を含むものであり、さらに実質的にそれと同等な性状の変異体も含まれる。さらに本発明においては、その遺伝子を利用して得られるポリペプチドの一部のアミノ酸を既存の肝炎ウイルス感染検出診断方法で検出されない肝炎ウイルス感染患者血清との反
25

応性を損なわない範囲で、除去、挿入、修飾、あるいは付加する等の改変を行うため、あるいは該アンチセンス配列DNAの核酸の機能を研究するためそれを除去、挿入、修飾、あるいは付加する等の改変を行ったもの、さらには肝炎ウイルス感染検出診断系においてあるいは転写活性
5 検出系において、さらには遺伝子工学的操作において有効な利用を図る目的でその一部のみを断片としたものも、例えば、それを含んだりすれば、本発明の新規なDNA配列に含まれる。

該DNAの処理にあたっては、制限酵素、例えば、ロバーツ (Roberts) ら、ヌクライック アシッド リサーチ (Nucleic
10 Acids Res.)、19、Suppl. 2077 (1991) に記載されたものなど、DNAポリメラーゼ、例えば、大腸菌DNAポリメラーゼ、クレノウ・フラグメント、大腸菌ファージT4 DNAポリメラーゼなど、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdTase)、エキソヌクレアーゼ、例えば、T4 DNAポリメラーゼ、大
15 腸菌エキソヌクレアーゼIII、λエキソヌクレアーゼなど、エンドヌクレアーゼ、例えば、DNase I、マイクロコッカス (Micrococcus) ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼS1など、リガーゼ、例えば、大腸菌DNAリガーゼ、T4 DNAリガーゼなどを用いたり、合成オリゴヌクレオチドを用いたりできる。また、当該分野で知られた遺伝子の
20 人工変異導入法、例えば、日本生化学会編、新生化学実験講座2、核酸III、組換えDNA技術、233～252頁、株式会社東京化学同人発行(1992年)などに記載の方法を利用することもできる。

こうして、本発明の新規なHBVのX領域由来のアンチセンス配列DNAとしては、配列表の配列番号1及び2に示すDNAの全配列、実質
25 的にそれと同等な性状の変異体、それから上記の方法で誘導されたDNA配列が含まれ、このようなDNA配列としては一本鎖であることもで

きるし、その相補鎖とハイブリダイズしている二本鎖であることもでき、また配列表の配列番号 1 及び 2 に示す DNA を制限酵素などで断片化したものも含まれることができる。本発明の新規な HBV の X 領域由来のアンチセンス配列 DNA としては、そのアンチセンス配列 DNA の全部
5 あるいはその一部と実質的に同等の機能を利用しうるものであるかぎり、それから誘導されたり、改変された配列であってよい。

本発明の新規な HBV の X 領域由来のアンチセンス配列 DNA でコードされるポリペプチド及びそれをコードする遺伝子並びにそれに関連した DNA 配列は、特に配列表の配列番号 1 及び 2 に示すもの、もしくは
10 はその全てあるいは一部を含むものであり、該ポリペプチドは既存の肝炎ウイルス感染検出診断方法で検出されない肝炎ウイルス感染患者血清と特異的に免疫化学的に反応させることが期待されている。先の本発明者らにより開示されたように新規な HBV の X 領域由来の新規なポリペプチド（134 個のアミノ酸残基からなる）は、既存の肝炎ウイルス
15 感染検出診断方法で検出されない肝炎ウイルス感染患者血清と特異的に免疫化学的に反応する。本発明においても、既存の肝炎ウイルス感染検出診断方法で検出されない肝炎ウイルス感染患者血清との反応性を損なわないような範囲で該ポリペプチドの一部のアミノ酸を除去、挿入、修飾、あるいは付加する等の改変を行ったもの、または該アンチセンス配
20 列 DNA の核酸を除去、挿入、修飾、あるいは付加する等の改変を行ったもの、さらには肝炎ウイルス感染検出診断系においてあるいは転写活性検出系において、さらには遺伝子工学的操作において有効な利用を図る目的でその一部のみを断片としたものも、例えば、それを含んだりすれば、本発明の新規なポリペプチド及びそれをコードする遺伝子に含ま
25 れる。

また、配列表の配列番号 3 に示すもの、もしくはその全てあるいは一

部を含むポリペプチドで、既存の肝炎ウイルス感染検出診断方法で検出されない肝炎ウイルス感染患者血清と異なった特異性で免疫化学的に反応するものも、かかる既存の肝炎ウイルス感染検出診断方法で検出されない肝炎ウイルス感染患者血清との反応性を損なわない範囲であるなら

5 その変異体や、その一部のアミノ酸を除去、挿入、修飾、あるいは付加する等の改変を行ったものも本発明の新規なポリペプチドに含まれる。また、この変異及び改変ポリペプチドをコードする遺伝子も本発明の範囲に含まれることが理解されよう。さらに、配列表の配列番号3に示すもの、その変異体もしくはその全てあるいは一部を含むポリペプチドは、

10 種々の遺伝子のエンハンサーやプロモーターの配列に特異的に作用することが期待されている。先の本発明者らにより開示されたように新規なHBVのX領域由来の新規なポリペプチド（134個のアミノ酸残基からなる）は、種々の遺伝子のエンハンサーやプロモーターの配列に特異的に作用する。本発明においては、同様に種々の遺伝子のエンハンサー

15 やプロモーターの配列との作用性を損なわない範囲でその変異のあるもの及びその一部のアミノ酸を除去、挿入、修飾、あるいは付加する等の改変を行ったものも本発明の新規なポリペプチドに含まれることは理解されるべきである。また、この改変ポリペプチドをコードする遺伝子も上記しているように本発明の範囲に含まれることは理解されるべきである。また同様に、配列表の配列番号3に示すもの、もしくはその全てあ

20 るいは一部を含むポリペプチドで、種々の遺伝子のエンハンサーやプロモーターの配列に異なった特異性で作用するものも、かかる種々の遺伝子のエンハンサーやプロモーターの配列への作用性を損なわない範囲であれば本発明の新規なポリペプチドに含まれる。

25 以下、配列表の配列番号1及び2に示されそして既存の肝炎ウイルス感染検出診断方法で検出されない肝炎ウイルス感染患者血清由来の新規

なHBVのcDNAクローンの取得方法を説明するとともに、該クローンの塩基配列を決定する方法を説明する。

- 本発明の配列表に示すB型肝炎ウイルス遺伝子のX領域由来のアンチセンス配列DNA、及びそれによりコードされた新規なアミノ酸配列をもつ新規なポリペプチドは、例えば、次のような方法によって得られる。
- すなわち、既存の肝炎ウイルス感染検出診断方法で検出されない肝炎ウイルス感染患者血清から核酸を抽出する。該血清としては、既存の肝炎ウイルス感染検出診断方法、HAV検査ラジオイムノアッセイキット、例えば、ダイナボット社製のラジオイムノアッセイHAV抗体検査キット、HBs-Ag、HBs-Ab、HBc-Ab、HBc-Ab、HBe-Ag、HBe-Abなどのラジオイムノアッセイ検査キット、例えば、ダイナボット社製のもの、及びHCV抗体検査キット、例えば、ダイナボット社製のHCV抗体検査PHAキットを用いての検査などで、その測定結果が全て陰性のものが使用される。非A-、非B-、非C-、非D-そして非E-型肝炎患者と診断された患者血清が好ましく使用される。こうして抽出された核酸からcDNAを得るに当たっては、サイキ(Saiki)らの開発したポリメラーゼチェーンリアクション法(PCR法)(ネーチャー(Nature)、324、126(1986))に準じて適宜その方法を改良して行うことができる。PCR法を適用し抽出された核酸から得られた第1の相補鎖DNA(1st cDNA)は、次にそれを鋳型にしてさらにPCR法を適用し、目的のDNA断片が得られるまで増幅させることができる。この場合、PCRの条件はプライマーの種類、組合わせ、増幅する長さ等によって、最適な条件が異なるので、適宜状況に応じてその条件を変えることができる。
- 例えば、PCRは、プログラムインキューベーター装置を用い、合成サイクルとして約93~95℃で約1分間、約45~55℃で約1.5分

間、そして約72℃で約1.5分間の処理を1サイクルとし、これを通常約20～50サイクル繰り返し、サイクル後にさらに約72℃で約10分間合成処理することが好ましい。ポリメラーゼとしては、Taq DNAポリメラーゼなどが好ましく用いられる（サイキ（Saiki）ら、サイエンス（Science）、239、487（1988））。使用されるプライマーは、既知のHBVの核酸配列を参考にデザインすることができ、例えば、HBVのEcoRIサイトから第1268-1287番目の核酸配列、第1295-1314番目の核酸配列、第1503-1522番目の核酸配列などに相当するセンス配列、また第1822-1841番目の核酸配列、第1822-1841番目の核酸配列などに相当するアンチセンス配列などが挙げられる。

こうして得られたDNA断片は、例えば、独立に3つ以上のクローンの塩基配列についてその両方の鎖に関し、配列決定する。配列の決定には、例えばジデオキシ法（サンガー（Sanger）ら、プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス ユー・エス・エイ（Proc. Natl. Acad. Sci. USA）、74、5463-5467, 1977）、マクサム・ギルバート（Maxam-Gilbert）法（マクサム（Maxam）ら、プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス ユー・エス・エイ（Proc. Natl. Acad. Sci. USA）、74、560-564, 1977）などの方法が挙げられる。好ましくは塩基配列の決定には、デュポン社製蛍光シーケンサー ジェネシス2000（Genesis 2000）システムなどを用いて、デュポン社の該システム用のプロトコールに従って行えば容易に決定できる。また、塩基配列の決定しにくいところや、決定しようとするDNA断片が約180塩基以上ある場合には、常法に従い、サブクローニングを行えば良い。

- クローニングには、例えばM13mp18などのM13クローニングベクター、λDASHII、EMBL3、EMBL4、シャロン（Charon）4A、シャロン28、λgt11、λZAPIIなどのλファージベクター、pBR322、pUC18、pUC118、pSP64、pSP65、pSL1180、pKMNI、pMW119、pGEM-3、pGEM-3Zf（-）、pBluescript KS（東洋紡）、pJB8、pCRTM（Invitrogen, USA）などのベクターを目的の応じて用いることができ、また市販のクローニングベクターの中から選んで用いることができる。
- 10 かくして決定された本発明のDNA断片の塩基配列は、例えば、配列表の配列番号1及び2に示された通りのものである。また肝臓組織からRNAを抽出し、それから逆転写酵素によりcDNAを合成し、PCR法で増幅し、必要に応じクローニングすることもできる。ところで、先の本発明者らにより開示された新規なHBVのX領域由来の新規なポリ
- 15 ペプチドは、そのアミノ酸配列が既知のHBVのX蛋白領域と明らかに相違するのは、73番目のLeuと131番目から134番目までのVal-Trp-Arg-Leuである。また既知のHBVのX蛋白領域がコードするアミノ酸は154個であるにもかかわらず、そのコード遺伝子のDNA断片のX蛋白領域ではコードするアミノ酸は134個である。
- 20 これはX領域遺伝子のうちの217番目が本発明の遺伝子の場合Cとなっていること、そして既知のX領域遺伝子のうちの395番目から402番目まで（既知のHBVの1770番目から1777番目まで）の8個の遺伝子配列TTGTACTAが欠失してい、そのため3'側のコドンが変化したことに起因することが示されている。すなわち、そこ
- 25 に記載の新規な蛋白は、これまでのHBVのX蛋白とその抗原性及びその生理的機能が全く異なるものである。本発明のDNAは、これら領域

のアンチセンス配列をなすもので、従って従来にない特徴的な配列を持つと共に、161個のアミノ酸残基からなるオープン・リーディング・フレーム（ORF）を生じている。こうして、この発明の蛋白も、これまでのHBVの蛋白とその抗原性及びその生理的機能が全く異なるものであることが期待される。この161個のアミノ酸残基からなるORF

5 の蛋白のうちには変異のある例が認められ、そのアミノ酸に置換がみられたり、N端側やC端側に付加や欠失が存在したりする可能性も認められ、こうした変異蛋白も実質的に同様な性状を示すかぎり含まれる。

本発明のHBVのX領域由来のアンチセンス配列DNAでコードされるポリペプチドは、遺伝子組換えの手法を用いて大量に産生することができる。例えば、上記PCR法で得られたDNA断片をリン酸化するか、あるいはリン酸化したプライマーを用いてPCR法を行い、クローニングに適したDNA断片とすることが好ましい。このリン酸化は通常の方法に準じて行うことができ、例えば、T4ポリヌクレオチドキナーゼ及びATPを用いて行う方法などが挙げられる。さらに必要に応じ、PCR産物は、クレノウ・フラグメント、T4DNAポリメラーゼなどにより組換えに適したように平滑化处理されたり、制限酵素認識配列を含んだプライマーを用いてPCR法を行った増幅産物をその制限酵素で処理するか、5'末端に接着配列を設けるなどの修飾を施して、PCR増幅

10 産物を作成するなどしてクローニングに適したものとすることが好ましい。上記161個のアミノ酸残基からなるORF部分のDNA断片を、適当な制限酵素部位を含むプライマーを使用してPCR法で大量に増幅し、次に必要に応じクローニングし、ついで発現ベクターに組換えて適当な宿主を形質転換させ、得られた形質転換体細胞で該配列を発現させて所要のポリペプチドを得ることができる。

15 20 25

本発明のX蛋白領域をコードする遺伝子のアンチセンス配列遺伝子（

cDNA) またはその断片を、必要に応じその5'末端を修飾して発現ベクターのプロモーターの下流に挿入し、次いで大腸菌、酵母、動物細胞などの宿主細胞に導入した後、得られた形質転換体を培養して、組換えX領域アンチセンス配列由来のポリペプチドを宿主細胞内外に産生させる。発現ベクターとしては、X蛋白領域をコードする遺伝子のアンチセンス配列遺伝子(cDNA) またはその断片を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが使用される。例えば、大腸菌、枯草菌、酵母などの微生物を宿主とするときには、発現ベクターはプロモーター、リボゾーム結合(SD)配列、X蛋白領域をコードする遺伝子のアンチセンス配列遺伝子(cDNA) またはその断片、転写終止配列、及びプロモーターを制御する遺伝子よりなることが好ましい。発現ベクターとしては、当該分野で知られたものあるいは当該分野で市販されたもの、またはそれらから合成オリゴヌクレオチド、制限酵素、リガーゼなどを用いて遺伝子組換え技術により誘導されたものの中からその目的に応じて選択して用いられ、例えば宿主大腸菌では、pTTQシリーズ(アマシャム(Amersham)社)、pKK233-2(ファルマシア(Pharmacia)社)、pPROKシリーズ(クロンテック(Clonotech)社)、pDR720(ファルマシア(Pharmacia)社)、pETシリーズ、pRSETシリーズ(インビトロジェン(Invitrogen)社)、pQEシリーズ(QIAGEN Inc.社)などが挙げられる。また、例えば、当該分野で知られた融合蛋白質として発現できるプラスミド(ベクター)及びそれらから外来遺伝子の発現に適するように制限酵素、合成オリゴヌクレオチドリンカー、リガーゼなどを用いて誘導された融合蛋白質発現系プラスミド(ベクター)を作製することが可能であり、そのプラスミドを用いて遺伝子組換え法により形質転換体を得ることができる。本発明で用いられるポリペプチ

ドをキメラ融合蛋白質として発現するために用いられるプラスミド（ベクター）としては、例えば大腸菌では β -ガラクトシダーゼ、グルタチオン S-トランスフェラーゼ、プロテインAのIgG結合領域、マルトース結合蛋白質、CKS、例えばCKSの全248個のアミノ酸配列のうち最初の239個のアミノ酸配列をもつもの、又は6個のヒスチジン残基を持つものと外来遺伝子である抗原とを融合蛋白質として発現できるプラスミドなどが挙げられ、例えばそれらはpEX系プラスミド（クロンテック（Clontech）社）、pUEX系プラスミド（アマシャム（Amersham）社）、pGEX系プラスミド（ファルマシア（Pharmacia）社）、pRIT系プラスミド（ファルマシア（Pharmacia）社）、pMAL系プラスミド（ニュー イングランド バイオラボズ（New England Biolabs）社）、pTB系プラスミド（アボット（Abbott）社）、pQE30～32ベクター（QIAGEN Inc. 社）など、また例えば酵母ではSODとの融合蛋白質として抗原を発現できるプラスミド、例えばSOD8-3などが挙げられる。融合部位は、例えば臭化シアン、ヒドロキシルアミン、ギ酸、酢酸-ピリジン溶液、2-（2-ニトロフェニルスルフェニル）-3-プロモインドール-スカトールなどの化学的な処理で切断しうるようなものか、トリプシン、リシルエンドプロテアーゼ、Xa因子、トロンビン、ヒト血漿カリクレインなどの酵素で切断しうるようなものとされていることができる。さらに、例えば宿主酵母では、YIp1、YIp5、YIp32などのYIp型ベクター、YEp13、YEp24、pAM82、pJDB219、pAT405などのYEp型ベクター、YRp7などのYRp型ベクター、YCp50などのYCp型ベクターなどが挙げられ、宿主動物細胞では、pcD、pcD-SR α 、CDM8、pCEV4、pME18S、BPV-I、EBV、レ

トロウイルスベクターなどが挙げられ、目的に応じて選択して用いられる。

宿主大腸菌としては、当該分野で広く使用されるもののうちから目的に応じて選択して用いられ、例えば大腸菌K12株、C600、MC1061、LE392、MV1184、DH1、DH5 α 、JM109、HB101、XL1-Blue、M15 [pREP4]などが挙げられる。宿主動物細胞も、当該分野で広く使用されるもののうちから目的に応じて選択して用いられ、例えばCOS7細胞などのCOS細胞、CHO DHFR⁻細胞などのCHO細胞、マウス骨髄腫細胞Sp2/0、マウスL TK⁻細胞などが挙げられる。

宿主細胞の形質転換は、常法に従い行うことができ、得られた形質転換体の培養も常法に従い行うことができ、例えば、モレキュラー クローニング (Molecular Cloning) (コールド スプリング ハーバー ラボラトリー (Cold Spring Harbor)、1982年) に記載の方法に準じて行うことができる。例えば、宿主として大腸菌を用いる場合、塩化カルシウム法、塩化ルビジウム法、ハナハン (Hanahan) 法などでコンピテントにされたコンピテント細胞と発現ベクターとを混合するなどして形質転換できる。例えば、宿主として動物細胞を用いる場合、リン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、リボソーム法、プロトプラスト法、ウイルス感染法などで発現ベクターを導入することにより形質転換できる。産生された組換えX領域アンチセンス配列由来のポリペプチドは、公知の方法により宿主細胞から単離・精製される。先ず形質転換体からの単離にあたっては、例えば、必要に応じ形質転換体を破碎などする。例えば、得られた形質転換体は、その大腸菌、酵母などの細胞を、ガラスビーズ、アルミナビーズなどを

備えていてもよいホモジュナイザー、ワーリングブレンダー、フレンチプレス、超音波破碎機などの機械的方法、リゾチームなどの酵素による方法、凍結融解や浸透圧による物理的方法あるいはドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、トウィーン（Tween：商品名）、トライトンX（Triton X：商品名）などの界面活性剤、アセトン、ブタノールなどの有機溶媒、EDTAなどのキレート化剤などを用いる化学的方法などにより破碎することができる。得られた形質転換体細胞液を、例えば硫酸アンモニウムなどの蛋白質沈殿剤などを用いての塩析、エタノールなどの有機溶媒による沈殿法、界面活性剤などを用いての抽出、透析、密度勾配遠心などの遠心分離法、限外濾過法、イオン交換樹脂、イオン交換セルロース、イオン交換セファデックス、アルミナ、ハイドロキシアパタイトなどによる吸着、カラムクロマトグラフィー、電気泳動法、デキストランゲル、ポリアクリルアミドゲル、ポリエチレングリコールジメタクリル酸ゲル、アガロースゲル、多孔質シリカガラス、分子ふるい法、モノクローナル抗体あるいはNi-NTA樹脂（QIAGEN Inc. 社）などを利用したアフィニティクロマトグラフィーにより分離、精製することがなされる。生成物は、必要に応じさらに、使用に適したものに加工できる。

上記161個のアミノ酸残基からなるORF部分のアミノ酸配列を参考に液相法や固相法として知られたペプチド化学合成法によりその部分ペプチドまたは改変ペプチドを合成することができる。合成ペプチドは必要に応じコンジュゲート化のためシステイン残基が付加されていてよい。選択されるアミノ酸配列としては、抗原決定基部位が好ましい。ペプチドの化学合成は、一般的には自動ペプチド合成装置により好適に行なうことが出来、例えば島津製作所製PSSM-8などを用いて行なうことができる。こうして得られた蛋白、ポリペプチド、合成ペプチドは

抗原として用いてそれらに対する特異抗体を調製するのに用いられる。抗原としてはそれをそのまま適当なアジュバントと共に用いてもよいが、合成ペプチドなどは必要に応じ適当な縮合剤などを用いて種々の担体蛋白、例えばキー・ホール・リムベット(Keyhole Limpet Hemocyanin; KL
5 H)、アルブミン、グロブリン、ポリリジンなどと結合させ免疫原性コンジュゲートとして用いられる。こうした調製される特異抗体は、その由来を特に限定されるものではなく、また、抗体は常法により得ることができる。例えば日本生化学会編、続生化学実験講座 5、免疫生化学研究法、東京化学同人、1986年及び日本生化学会編、新生化学実験講座
10 12、分子免疫学 Ⅲ、抗原・抗体・補体、東京化学同人、1992年などに記載の方法に準じて、例えばウマ、ウシ、ヒツジ、ウサギ、ヤギ、ラット、マウスなどの哺乳動物等に抗原を投与して免疫し、得られる抗血清、腹水液をそのまま、あるいは従来公知の方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿法などの塩析、セファデックスなどによるゲル濾過法、イ
15 オン交換クロマトグラフィー法、電気泳動法、透析、限外濾過法、アフィニティ・クロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー法などにより必要に応じ精製して用いることができる。また、抗原などで免疫した哺乳動物など（例えばマウス）の脾臓細胞と骨髓腫細胞（ミエローマ細胞）からハイブリッド細胞（ハイブリドーマ）を得、培養してモノ
20 クローナル抗体を作成したり、これを更に修飾してもよい。モノクローナル抗体は、ケラー及びミルシュタイン（Kohler, G. & Milstein, C., Nature, 256, 495, (1975)）などにより開示されたマウスミエローマ細胞を用いての細胞融合技術を利用して得られたモノクローナル抗体であってもよい。抗体はIgG、I
25 gM、IgAといった各分画を用いることが出来る。またこれらをパパイン、トリプシン、ペプシンなどの酵素により処理し、Fab、Fab'

- といった抗体フラグメントにして使用してもよい。さらにこれら抗体は単一で使用しても、複数の抗体を組み合わせ使用してもよい。抗体には標識物を付与することができ、IgG画分、更にはペプシン消化後還元して得られる特異的結合部F a b'を用いて標識化することができる。
- 5 標識物の例としては、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼあるいは β -D-ガラクトシダーゼなどの酵素、化学物質、蛍光物質、発色物質、磁気物質、金属粒子、例えば金コロイドなど、放射性同位体などがある。標識化は当該分野で用いられる方法を適宜用いることができる。
- 10 上記抗原及び特異抗体は必要に応じ、例えば吸着、架橋化法などで固相化できる。抗原あるいは抗体を固相化できる担体は、当該分野で用いられる公知のものの中から適宜選んで用いることができる。例えば活性化ガラス、多孔質ガラスなど、シリカゲル、シリカーアルミナ、アルミナ、磁化合金などの無機材料、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリフッ化ビニリデン、ポリ酢酸ビニル、ポリメタクリレート、
- 15 ポリスチレン、スチレン-ブタジエン共重合体、ポリアクリルアミド、架橋ポリアクリルアミド、スチレン-メタクリレート共重合体、ポリグリシジルメタクリレート、アクロレイン-エチレングリコールジメタクリレート共重合体、ナイロンなどのポリアミド、ポリウレタン、ポリエポキシ樹脂などの有機高分子物質、架橋化アルブミン、コラーゲン、ゼラチン、デキストラン、架橋デキストラン、アガロース、架橋アガロース、セルロース、微結晶セルロース、カルボキシメチルセルロース、セルロースアセテートなどの天然物またはその変成物、乳化重合物、細胞、赤血球などが挙げられる。ろ紙、ビーズ、試験容器の内壁、例えば試験管、タイタープレート、タイターウェル、ガラスセル、合成樹脂製セル
- 20 などの合成材料からなるセル、ガラス棒、合成材料からなる棒、各種の形態の固体物質（物体）の表面などが挙げられる。
- 25

本発明では、こうした変異B型肝炎ウイルス遺伝子のX領域由来のアンチセンス配列遺伝子由来の蛋白やポリペプチド、その部分断片、実質的にそれらのうちのひとつと同等な性状の変異体、さらにはそれらのうちのいずれか一つに対する特異抗体を利用して変異HBV感染の検出測定
5 診断手段が提供される。変異HBV感染は、特異抗体を用いてウイルス抗原を免疫染色したりして検出測定したり、組換えウイルス抗原あるいは化学合成抗原によるウイルスに対する特異抗体の検出測定などであることもできるし、こうした抗原抗体反応生成物を標識二次抗体、ビオチン-アビジン系などで検知可能にする手法を含むこともできる。例えば
10 日本生化学会編、続生化学実験講座5、免疫生化学研究法、東京化学同人、1986年及び日本生化学会編、新生化学実験講座12、分子免疫学Ⅲ、抗原・抗体・補体、東京化学同人、1992年などに記載の方法に準じ変異HBV感染の検出測定診断系を組立てることが可能である。

本発明の測定方法で測定される試料としては、あらゆる形態の溶液やコロイド溶液などが使用しうるが、好ましくは生物由来の流体試料、例えば血液、血漿、その他の体液、肝臓組織、細胞培養液、組織培養液などが挙げられる。特に好ましくは血漿、血清、肝臓組織などが挙げられる。

15

実施例

次に実施例を示して、本発明を更に具体的に説明する。本発明の要旨
20 に従うかぎり、本発明は、以下の実施例に限定されない。

実施例1から実施例6の実験操作では、基本的に試料の汚染に注意するため、例えば、各反応液への試料の調製、試薬等の全ての操作で用いられたピペット等の器具は、1回使用することに交換する。

また、特に方法を記さないで行った次に示す基本的な遺伝子操作は、
25 それぞれの操作の後に、括弧内に示す実験書や試薬販売会社が添付した

プロトコールに従って行った。

実施例1 既存の肝炎ウイルス感染検出診断方法で検出されない肝炎
ウイルス感染患者血清からの核酸の抽出

既存の肝炎ウイルス感染検出診断方法、すなわち、抗HAV IgM
5 抗体（ラジオイムノアッセイ検査キット（RIA）、ダイナボット社製）、HBs-Ag（RIA、ダイナボット社製）、抗HBc抗体（RIA、ダイナボット社製）、抗HBc IgM抗体（RIA、ダイナボット社製）、抗HCV抗体（エンザイムイムノアッセイ（ELISA）、ダイナボット社製）、抗D型肝炎ウイルス抗体（RIA、ダイナボット社製）、抗E型肝炎ウイルス抗体（ELISA、本発明者ら、アクタ
10 パソロ ジャパン（Acta Pathol. Jpn. ），43：94-98，1993）、抗ヘルペス シンプレックス ウイルス IgM抗体（ELISA、デンカ生検社製）、及び抗サイトメガロ ウイルス IgM抗体（ELISA、デンカ生検社製）について、血清の検査
15 をしても、陰性である肝炎ウイルス感染患者（E88と称する）からの血清を出発材料とした。患者E88は、非A-、非B-、非C-、非D-そして非E-型肝炎患者とされ、急性症状を示し、劇症であった。

また同様に、肝炎ウイルス感染患者で、HBs-Ag（RIA、ダイナボット社製）、抗HBc抗体（RIA、ダイナボット社製）、抗HCV
20 抗体（ELISA、ダイナボット社製）、及び抗D型肝炎ウイルス抗体（RIA、ダイナボット社製）について、血清の検査をしても、陰性である肝炎ウイルス感染患者（H2と称する）からの血清も出発材料とした。患者H2も、非A-、非B-、非C-、非D-そして非E-型肝炎患者とされたが、慢性症状を示していた。

25 患者血清のそれぞれ100 μ lに、12.0mM Tris-HCl 緩衝液（pH8.0）、10.0mM EDTA、0.6%ドデシル硫

- 酸ナトリウム、トリス緩衝液 (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、12.0 μ g/ml のプロテナーゼ K (Proteinase K、ファルマシア社製) からなる細胞膜破壊液 (lysis buffer) 300 μ l を混合し、70°C で 3 時間インキュベーション処理する。
- 5 フェノール/クロロホルムでもって、DNA を抽出し、エタノールで沈殿させた後、100 μ l の水に溶解する。

実施例 2 HBV DNA の合成

- 実施例 1 で得られた 2 名の患者由来のそれぞれの核酸 E 88 及び H 2 溶液を鋳型として用い、下記に示すようにして HBV DNA を PCR 法 (ネーチャー (Nature)、324、126 (1986)) で増幅した。PCR プライマーとして 380 B DNA シンセサイザー (アプライド バイオシステムズ ジャパン社製) を用い以下の配列のヌクレオチドを合成した。ヌクレオチドの番号は HBV の EcoRI サイトから始まるものである。
- 10

- 15 (i). 第 1 段の PCR 処理用

(1) プレー C/C 領域

p 142 5' -GACTGGGAGGAGTTGGGGGA-3' :

センス配列 1730 ~ 1749 番目、配列表の配列番号 4

p 144 5' -GGATTAAAGACAGGTACAGT-3' :

- 20 アンチセンス配列 2510 ~ 2529 番目、配列表の配列番号 5

(2) ポリメラーゼセグメント遺伝子領域

p 208 5' -AGGCAGGTCCCCTAGAAGAA-3' :

センス配列 2364 ~ 2383 番目、配列表の配列番号 6

p 210 5' -GGGTTGAAGTCCCAATCTGG-3' :

- 25 アンチセンス配列 2976 ~ 2995 番目、配列表の配列番号 7

(3) プレーS領域

p191 5' -GGCATTAACCTTATTATCC-3' :

センス配列2696~2715番目、配列表の配列番号8

p193 5' -TGGAGGACAAGAGGTTGGTG-3' :

5 アンチセンス配列338~357番目、配列表の配列番号9

(4) 表面蛋白領域

p183 5' -CCATATCGTCAATCTCCTCG-3' :

センス配列113~132番目、配列表の配列番号10

p185 5' -AAGACCCACAATTCTTTGAC-3' :

10 アンチセンス配列991~1010番目、配列表の配列番号11

(5) ポリメラーゼセグメント遺伝子領域

p203 5' -ATGTGGTATTGGGGGCAAG-3' :

センス配列748~767番目、配列表の配列番号12

p205 5' -GGTCGTCCGCGGGATTCAGC-3' :

15 アンチセンス配列1442~1461番目、配列表の配列番号13

(6) X領域

p197 5' -CCATACTGCGGAACCTCCTAG-3' :

センス配列1268~1287番目、配列表の配列番号14

p201 5' -ATTAGGCAGAGGTGAAAAG-3' :

20 アンチセンス配列1822~1841番目、配列表の配列番号15

(ii). 第2段のPCR処理用

(1) プレーC/C領域

p86 5' -GGAGATTAGGTTAAAGGTCT-3' :

センス配列1750~1769番目、配列表の配列番号16

25 p89 5' -AGACAGGTACAGTAGAAGAA-3' :

アンチセンス配列2503~2522番目、配列表の配列番号17

(2) ポリメラーゼセグメント遺伝子領域

p 209 5' -AGAACTCCCTCGCCTCGCAG-3' :

センス配列 2383~2402 番目、配列表の配列番号 18

p 211 5' -AGGGTCCAACCTGGTGATCGG-3' :

5 アンチセンス配列 2932~2951 番目、配列表の配列番号 19

(3) プレ-S領域

p 192 5' -ATATAAGAGAGAACTACAC-3' :

センス配列 2785~2804 番目、配列表の配列番号 20

p 194 5' -AAACCCCGCCTGTAACACGA-3' :

10 アンチセンス配列 194~213 番目、配列表の配列番号 21

(4) 表面蛋白領域

p 184 5' -CTCCTCGAGGACTGGGGACC-3' :

センス配列 126~145 番目、配列表の配列番号 22

p 186 5' -ACATACTTTCCAATCAATAG-3' :

15 アンチセンス配列 973~992 番目、配列表の配列番号 23

(5) ポリメラーゼセグメント遺伝子領域

p 204 5' -CTGTACAAGATCTTGAGTCC-3' :

センス配列 769~788 番目、配列表の配列番号 24

p 206 5' -CCGACGGGACGTAGACAAAG-3' :

20 アンチセンス配列 1421~1440 番目、配列表の配列番号 25

(6) X領域

p 198 5' -TTTTGCTCGCAGCCGGTCTG-3' :

センス配列 1295~1314 番目、配列表の配列番号 26

p 201 5' -ATTAGGCAGAGGTGAAAAAG-3' :

25 アンチセンス配列 1822~1841 番目、配列表の配列番号 27

(iii) . インターナル・ヌクレオチド配列

(1) プレーC/C領域

p 1 4 1 5' -TTGCCTTCTGACTTCTTTCC-3' :

センス配列 1 9 5 7 ~ 1 9 7 6 番目、配列表の配列番号 2 8

5 (2) ポリメラーゼセグメント遺伝子領域

p 2 1 2 5' -TTTAATCCTGAATGGCAAAC-3' :

センス配列 2 5 2 1 ~ 2 5 4 0 番目、配列表の配列番号 2 9

(3) プレーS領域

p 1 9 5 5' -CTCAAACAATCCACATTGGG-3' :

10 センス配列 2 9 6 6 ~ 2 9 8 5 番目、配列表の配列番号 3 0

(4) 表面蛋白領域

p 1 8 2 5' -TGTGTCTGCGGCGTTTTATC-3' :

センス配列 3 8 0 ~ 3 9 9 番目、配列表の配列番号 3 1

(5) ポリメラーゼセグメント遺伝子領域

15 p 2 0 7 5' -CTATTGATTGGAAAGTATGT-3' :

センス配列 9 7 3 ~ 9 9 2 番目、配列表の配列番号 3 2

(6) X領域

p 2 0 2 5' -CTGCCGTTCCGGCCGACCAC-3' :

センス配列 1 5 0 3 ~ 1 5 2 2 番目、配列表の配列番号 3 3

20 上記のようにして調製された2名の患者由来のそれぞれの核酸水溶液の5 μ lを用い、上記合成プライマーを用いサイキ (Saiki) らの方法 (ネーチャー (Nature)、324、126 (1986)) に準じて特異的な配列の増幅を行った。

PCR法は、まずDNA試料それぞれ5 μ l、各合成プライマー0.

25 25 μ M、Taq DNAポリメラーゼ (パーキン エルマー シータス (Perkin-Elmer Cetus、米国) 1ユニット、PC

R緩衝液 (50 mM KCl、10 mM Tris-HCl (pH 8.3)、1.5 mM MgCl₂、0.002%ゼラチン) 及びそれぞれ100 μMのdNTPを、蒸留水で合計100 μlになるようにした。

この反応用試料を、プログラムインキュベーター装置 (パーキン エルマー シータス社製) でもって、94℃で1分間変成処理、55℃で1分間アニーリング処理、72℃で2分間伸長反応処理からなる1サイクルの処理を、計40サイクル行った。

実施例3 増幅されて得られた2名の患者由来のDNA断片のクローニングと塩基配列の決定

10 実施例2において得られたそして既存の肝炎ウイルス感染検出診断方法で検出されない肝炎ウイルス感染患者2名の血清から調製された第2段のPCR処理で得られた増幅DNA断片を、それぞれ2%のアガロースゲルを用いた電気泳動にかけ、エチジウム ブロマイド蛍光により可視化し、切り出されたゲルを抽出した (モレキュラー クローニング (15 Molecular Cloning) (コールド スプリング ハーバー ラボラトリー (Cold Spring Harbor)、1982年))。抽出にはジェネクリーン (Geneclean) IIキット (バイオ (BIO) 101社製、米国) を用い、このキットに添付されているプロトコールに従った。

20 精製し、抽出したDNA断片を、20 μlの水に溶解し、その5 μlずつを、シーケンス キット (ユナイテッド ステイツ バイオケミカル コーポレイション (United States Biochemical Corp.) 社製) を用い、ジデオキシ シーケンス法により配列決定した。上記PCRプライマーとインターナル・ヌクレオチドプライマーをシーケンスプライマーとして用いた。

25

該それぞれのDNA断片のHBVのX領域部分の+鎖及び-鎖の塩基配列を決定した。既存の肝炎ウイルス感染検出診断方法で検出されない肝炎ウイルス感染患者2名の血清から調製された増幅E88DNA及びH2DNA断片の-鎖はそれぞれ配列表の配列番号1及び2に示す通りの塩基配列を含有している。

配列表の配列番号34には、+鎖の塩基配列が示され、その第1376番目から第1829番目までがHBVのX蛋白領域であるが、そこにコードされるポリペプチドのアミノ酸配列では、既知のHBVのX蛋白領域と73番目のLeuと131番目から134番目までのVal-Trp-Arg-Leuにおいて明らかに相違する。また既知のHBVのX蛋白領域がコードするアミノ酸は154個であるにもかかわらず、該+鎖のDNA断片のX蛋白領域遺伝子ではコードするアミノ酸は134個である。これはX領域遺伝子のうちの217番目が該+鎖の遺伝子の場合Cとなっていること、そして既知のX領域遺伝子のうちの395番目から402番目まで（既知のHBVの1770番目から1777番目まで：配列表の配列番号34の1769番目と1770番目の間）の8個の遺伝子配列TTGTACTAが欠失してい、そのため3'側のコドンが変化したことに起因する。すなわち、この+鎖でコードされる蛋白は、これまでのHBVのX蛋白とその抗原性及びその生理的機能が全く異なるものである。

配列表の配列番号1及び2に示す-鎖の塩基配列は、HBVのX蛋白領域のアンチセンス配列に相当するものであり、今回解明されたその配列からそれが従来にない特徴的な配列を持つと共に、161個のアミノ酸残基からなるオープン・リーディング・フレーム（ORF）の存在が確認された。配列表の配列番号3にはこのペプチドの配列が示されており、配列表の配列番号1の塩基配列の第1384番目から第1869番

- 目までの配列によりコードされている。以下このコードされている蛋白をASXPとも呼ぶ。このアンチセンス配列でコードされる蛋白は、これまでのHBVの蛋白とその抗原性及びその生理的機能が全く異なるものであることが期待される。またASXPのうちには変異のある例が認められ、そのアミノ酸に置換がみられたり、N端側やC端側に付加や欠失が存在したりする可能性も認められ、こうした変異ASXPも実質的に同様な性状を示すかぎり、本発明に含まれる。

実施例4 既存肝炎ウイルス検出法陰性患者でのASXPのmRNAの発現の検証

10 (1) 肝臓組織からの全RNAの抽出

実施例1で記載したように既存の肝炎ウイルス感染検出診断方法で血清の検査をしても陰性である患者（以下「F型肝炎患者」（血清マーカー陰性＝サイレントB型肝炎患者）という）に肝生検を施して得られた肝臓組織からRNAを抽出する。

- 15 慢性F型肝炎患者10人及び非ウイルス肝炎患者（コントロール）のそれぞれに肝生検を施して得られた肝臓組織をRNAzol™ B (BIOTECH LABORATORIES, INC., USA) キットを用いその試薬キットに添付の処理方法の指針に従い処理し、RNAを抽出した。そのキットに添付の処理方法の指針は、約1～10mgとい
- 20 う少量の組織からRNAを抽出する手法に関するものである。肝生検で得られた少量の肝臓組織をRNAzol™ Bの0.8ml中でホモジナイザー（「イボ付ホモジナイザー」、岩城硝子製）によりホモジュネート処理する。次にこうして得られたホモジュネートをエッペンドルフ型チューブに移した後、400μlのクロロフォルムを加え4℃で5分
- 25 間試料液を保持し、次に15分間そのエッペンドルフ型チューブ中の試

料を12,000×gで遠心し、2相に分かれた試料液（下相はブルーのフェノール・クロロフォルム相で上相は無色の水性相で、DNA及び蛋白質は2相の境界及び有機相にある）から水性相を集め、その水性相を0.5mlのイソプロパノールにより処理し4℃で45分間から1昼夜かけてRNAを沈殿させる。RNA沈殿物を15分間12,000×gで遠心処理した後分離したRNA沈殿物を0.8mlの75%エタノールで1回洗浄処理して、4℃あるいは-20℃で8分間7,500×gで遠心処理してペレット状のRNA試料を得た。必要に応じ上記イソプロパノールを添加の後4℃でその試料は1昼夜保存できる。

10 こうして得られたペレット状のRNA試料は0.5%SDS液（pH7）あるいは1mMEDTA液（pH7）に穏やかな処理で溶解される。好ましくはジエチルピロリン酸（DEPC）処理されたRNaseフリーの液を用い、60℃で10～15分間インキュベーション処理し溶解される。

15 (2) 肝臓組織全RNAからcDNAの合成

上記(1)で得られた肝臓組織全RNA試料を用い、Superscript RNase H⁻ (reverse transcriptase) キット（BRL社）を使用してcDNAに逆転写する。

20 cDNA 1st strandの合成は、ランダム・プライマー（random primer）として80μMの濃度のpd(N)。（宝酒造社製）を用い、上記(1)で得られた肝臓組織全RNA試料5μl、80μMのランダム・プライマー液2μl及び水4.5μlからなる液を70℃で10分間インキュベーション処理し、氷上ですばやく冷却する。Superscript RNase H⁻ キット（BRL社）
25 に添付の反応用緩衝液（reaction buffer）の5倍希釈液4μl、0.1Mのジチオスレイトール（DTT）液2μl、10

mMのdNTP (Superscript RNase H⁻ キット (BRL社) に添付) 1 μ l 及びRNase inhibitorの1 μ l を添加し、良く混合する。次にその混合物にSuperscript RNase H⁻ キット (BRL社) に添付のreverse transcriptase 0.5 μ l (100ユニット) を添加し、37℃で1時間インキュベーション処理した後70℃で10分間処理する。
cDNA 2nd strandの合成は、プライマーとしてオリゴdTプライマー (oligo dT primer) を用い、試料5 μ l、オリゴdTプライマー1 μ l 及び水5.5 μ l からなる液を用いた以外はcDNA 1st strandの合成と同様に処理した。こうして肝臓組織全RNAからcDNAが合成される。

(3) 逆転写により合成されたcDNAのPCR法による増幅

上記(2)で得られたcDNAを鋳型として用い、実施例2と同様にしネーチャー (Nature)、324、126 (1986)) に準じてPCR法で合成した。

合成プライマーを380B DNAシンセサイザー (アプライド バイオシステムズ ジャパン社製) を用い以下の配列のヌクレオチドを合成した。

p250 5' -ATGGTGCTGGTGAACAGACC-3' :

20 配列表の配列番号35

p251 5' -TCGGAACCGACAACCTCTGTT-3' :

配列表の配列番号36

PCR法は、まずDNA試料それぞれ5 μ l、各合成プライマー0.25 μ M、Taq DNAポリメラーゼ (パーキン エルマー シータス (Perkin-Elmer Cetus、米国) 1ユニット、PCR緩衝液 (50mM KCl、10mM Tris-HCl (pH8.

3)、1. 5 mM $MgCl_2$ 、0. 002%ゼラチン)及びそれぞれ100 μM のdNTPを、蒸留水で合計100 μl になるようにした。

この反应用試料を、プログラムインキュベーター装置(パーキン エルマー シータス社製)でもって、94℃で1分間変成処理、55℃で
5 1分間アニーリング処理、72℃で2分間伸長反応処理からなる1サイクルの処理を、計40サイクル行った。

(4) PCR産物DNAの検出

上記(3)で増幅されたPCR産物であるDNA試料をミニゲルを用いたアガロース電気泳動にかけ、エチジウム・ブロマイドで染色してDNAバンドを検出した。
10

1%アガロース・ミニゲルは、1gのアガロース(岩井化学)と100 mlのTAE緩衝液(9. 68 gのTris、2. 8 mlの酢酸及び1. 577 gのEDTA・三ナトリウムを蒸留水を加え約90 mlにし、次に酢酸を加えてpH 7. 8に調整した後蒸留水で100 mlとなるようにする)を混合後電子レンジに入れて加熱してアガロース溶解後、型に入れて冷却することにより得られる。こうして得られたslab gelを300 mlのTAE緩衝液を入れた泳動槽に装着する。泳動するDNA試料を色素液(グリセロール30%、プロモフェノールブルー(BPB) 0. 25%及びキシレンシアノール(XC) 0. 25%含有)と混ぜ、ゲルのスロットに注入する。DNA試料5 μl + 色素液1 μl となるようにゲルにかける。定電圧(約50~150 V)で30~35分間電気泳動する。泳動後ゲル板にエチジウム・ブロマイド液(100 mlの蒸留水+5 μl のエチジウム・ブロマイド)にひたし染色処理し、10~30分間放置したのち水洗し、紫外線照射器を用いてDNAバンドを観察するか、写真に撮ってDNAバンドを観察する。
15
20
25

結果は、F型肝炎患者10人のうち3人において特異的なバンドが存

在することを確認した。一方コントロールの非ウイルス肝炎患者では全て陰性であった。

(5) PCR産物DNAのクローニング及び配列決定

5 上記(3)で増幅されたPCR産物であるDNA試料をTA Cloning™ (Invitrogen, USA) キットを用いその試薬キットに添付の処理方法の指針に従い処理し、pCR™ ベクターにクローニングし、実施例3と同様にしてその配列の決定をした。

10 TA Cloning™ (Invitrogen, USA) キット中のpCR™ ベクターを8.8 μ lのTE緩衝液(Tris-HCl (pH 7.5) 10 mM及びEDTA 1 mM)に懸濁し、最終的に25 ng/ μ lの濃度とし、これを再懸濁pCR™ ベクター液とする。上記(3)で増幅されたPCR産物であるDNA試料1 μ l、10×ライゲーション緩衝液1 μ l、再懸濁pCR™ 11ベクター液2 μ l、T4 DNAリガーゼ試薬1 μ l及び蒸留水5 μ lからなるライゲーション
15 反応液を12℃で少なくとも4時間、好ましくは一晩インキュベーション処理した。TA Cloning™ (Invitrogen, USA) キットに添付の処理方法の指針では、pCR™ ベクターとPCR産物であるDNAとのモル比は、1:1~1:3とすることが推奨されているのでそれに従った。

20 LBアガー培地(アガー7~8 g、トリプトン10 g、イーストエキストラクト5 g、塩化ナトリウム10 gを蒸留水に入れ、水酸化ナトリウムで中和し、最終的に1リットルにする)からなるプレートには適当な抗生物質(50 μ g/mlのカナマイシンあるいは50 μ g/mlのアンピシリン)を添加してある。5-ブロモ-4-クロロ-3-インド
25 リル- β -D-ガラクトシド(X-Gal) 40 mgを1 mlのジメチルホルムアミド(DMF)に溶解し、4% X-Gal液とする。この4

%X-Gal 液 $25\mu\text{l}$ を 10cm の LB アガープレート の中央に垂らし、ガラス・スプレッターで塗り広げ、X-Gal・LB アガープレートとする。SOC 培地は、トリプトン (Difco) 20g 、イーストエキストラクト 5g 、塩化ナトリウム 0.585g 、塩化カリウム 0.186g 、塩化マグネシウム 10mM 及び硫酸マグネシウム 10mM を蒸留水で 1リットル (最終 pH $6.8\sim 7.0$ にする) にして作成した SOB 培地に 10ml の 2M グルコース液を添加して作成される。

0.5M の β -メルカプトエタノール液 $2\mu\text{l}$ を TA CloningTM (Invitrogen, USA) キットに添付の One ShotTM コンピテント細胞の $50\mu\text{l}$ バイアル中に添加する。次に上記ライゲーション反応の結果得られた液 $1\mu\text{l}$ を上記コンピテント細胞液に添加し、 30 分間氷の上でインキュベーション処理した。次にコンピテント細胞液バイアルを 42°C の浴槽につけ 30 秒間インキュベーション処理し、次に 2 分間氷の上に置き、予め 42°C に温めてある SOC 培地 $450\mu\text{l}$ を添加し、そのバイアルをシールした後 225rpm で回転式シェイキング・インキュベーター中で 37°C で 1 時間処理し、次に氷の上に置き、形質転換細胞液を得る。この形質転換細胞液から $25\mu\text{l}$ ~ $100\mu\text{l}$ を採取し、抗生物質及び X-Gal を含有する X-Gal・LB アガープレートに播く。プレートを裏返して、 37°C の培養器中で一晩インキュベーション処理した。白色のコロニー (場合によっては薄いブルーのコロニー) を選別し、シーケンシングに用いた。シーケンシングは、実施例 3 と同様にして行い、その配列の決定をした。

このシーケンシングの結果、pCRTM 11 ベクターにクローニングされた PCR 産物である DNA の塩基配列は ASXP に相当するもので、上記得られた PCR 産物が ASXP 遺伝子に由来するものであることが確認できた。なお、F 型肝炎患者 10 人のうち 7 人について PCR によ

る結果は陰性であったが、これはASXPのmRNA量がPCRの感度以下であった可能性もあり、全面的にASXPのmRNAが無いことを意味するものではない。こうしてF型肝炎患者の肝臓ではASXP遺伝子がmRNAに転写されている可能性が確認された。

5 実施例5 既存肝炎ウイルス検出法陰性患者肝臓でのASXP蛋白発現の検証

 (1) ASXP蛋白に対する特異抗体の作成

 クローニングにより得られたF型肝炎患者由来のHBV DNAを鋳型にして実施例2と同様にしネーチャー (Nature)、324、1
10 26 (1986)) に準じてPCR法で全アンチセンスXのORFを増幅合成した。このPCR産物をpQEベクターに組み込み、大腸菌で発現させた。PCR法に用いた合成プライマーには予め制限酵素部位Sph IとHind IIIを設けておく。そのPCR用プライマーは次の配列を有する：

15 (配列表の配列番号37)

 (Hind III)

p222 5'-TAG TAC AAG CTT TTA TCG GAA CCG ACA ACT CT-3' :

p225 5'-TAG TAC GCA TGC ATG GTG CTG GTG AAC AGA CC-3' :

 (Sph I)

20 (配列表の配列番号38)

 PCR産物であるDNA試料を制限酵素Sph IとHind IIIで消化して得られた断片を、PQEプラスミドを制限酵素Sph IとHind IIIで消化して得られた断片とライゲーションする (QIAexpress™キット (QIAGEN Inc., USA) を用いその試薬
25 キットに添付の処理方法の指針に従い処理し、例えばpQE™-30ベク

ターをHind III/Sph Iによるdouble digestion処理し得られた断片にライゲーションする)。ライゲーション反応は、PQEプラスミド液(約100 ng) 2 μ l、PCR産物3 μ l、 \times 10ライゲーション緩衝液3 μ l、5 mMのATP液2 μ l、T4 DNA Ligase (Takara) 2 μ l及び蒸留水18 μ lからなる反応混合物30 μ lを4℃で一晩インキュベーション処理した。このライゲーション産物をJM109 Transformation Kit (Toyobo) に添付の処理方法の指針に従い処理し大腸菌株M15を形質転換処理した。形質転換体細胞はアンピシリンを含有するLBプレートにまき、一晩37℃でインキュベーション処理した。IPTGは20 mg/ml濃度の水溶液をプレート当たり10 μ l、X-Galは20 mg/ml濃度のDMF溶液をプレート当たり40 μ l用いた。SOC培地はJM109 Transformation Kit (Toyobo) に添付の処理指針に従った。出現したコロニーからminiprep法でプラスミドを精製し、Hind III/Sph Iによるdouble digestion処理した後、minigelにかけ、特異バンドの観察されるプラスミドがASXPのORFを含んでいるとした。ASXPのORFを含んでいるクローニングされた発現ベクターで大腸菌株M15 [pREP4] を宿主として形質転換し、得られた形質転換体を発現させた。組換え蛋白質はQIAexpress™キット (QIAGEN Inc., USA) を用いその試薬キットに添付の処理方法の指針に従い処理し精製処理した。一方ASXP蛋白のアミノ酸配列の一部を持つ合成ペプチドを4種類合成して抗原とした。その合成ペプチドは次のアミノ酸配列を有するものである:

25 XAS-1: N-末端 VSMRRAEVRRSAHGSADEKAQTGRPRKERCAP C-末端
(配列表の配列番号39)

XAS-2: N-末端 GPETGRPRDSAPTGRRQRTSRAG C-末端

(配列表の配列番号 40)

XAS-3: N-末端 SMRRAEVRSSAHGS C-末端

(配列表の配列番号 41)

5 XAS-4: N-末端 PRKERCAPWSAGTAEEDGDRGPN C-末端

(配列表の配列番号 42)

上記配列の合成ペプチドのC末端にCysを付加したペプチドをペプチド合成機PSSM-8(島津製作所)により合成し、高速液体クロマトグラフィーにより精製し、次にKLHとマレイミド法を用いて、コンジュゲート化する。

上記で得られた組換えASXP蛋白及びコンジュゲート化合成ペプチドを抗原として用い、それぞれフロイント完全アジュバントを用いてエマルジョンとし、ウサギを免疫する。コンジュゲートを100 μ g/投与とし、ウサギに2週間置きに3回筋肉内投与を行う。免疫後ウサギ血液より抗血清を得る。いずれも20万倍以上のタイターのポリクローナル抗体を得た。これら5種類の抗体を各々500倍希釈で混合してASXP蛋白に対する特異抗体として用いた。

15

(2) ASXP蛋白に対する特異抗体による患者肝臓組織の免疫染色

慢性F型肝炎患者5例及び非ウイルス肝炎患者(コントロール)3例のそれぞれに肝生検を施して得られた肝臓組織を、上記(1)で得られたASXP蛋白に対する特異抗体を用いて免疫染色し、肝臓組織でASXP蛋白が発現しているか否かを測定する。

20

肝生検を施して得られた肝臓組織は、それぞれホルマリン固定し、パラフィン包埋処理した後薄切りして肝パラフィン薄切切片とする。次に脱パラフィン処理し、リン酸塩緩衝化食塩液(phosphate-buffered saline: PBS)で10分間洗った後、上記(

25

1) で得られた5種類の抗体が混合されて含まれているASXP蛋白に対する特異抗体を1, 000倍希釈とし、第一抗体として反応させる。

4℃で一晩反応させた後PBSで10分間洗った後、ペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗ウサギIgG (ヤギIgG/Fab') (MBL社) を500倍希釈とし、第二抗体として反応させる。37℃で1時間反応させた後PBSで10分間洗った後、過酸化水素含有ジアミノベンジン液で発色処理して肝組織切片の免疫染色を観察した。

結果は慢性F型肝炎患者5例中4例で陽性であったが、コントロール3例ではすべて陰性であった。陽性産物は肝細胞の細胞質にほぼ慢性に認められ、陽性細胞は集まっている傾向が観察された。

実施例6 既存肝炎ウイルス検出法陰性患者血清中のASXP蛋白に対する特異抗体の測定

急性F型肝炎患者血清、慢性F型肝炎患者血清及び正常ヒト血清についてELISA測定を行った。

実施例5の(1)で合成したXAS-1抗原の溶液(50μg/ml)を50μlずつウェルに添加する。4℃で一晩静置した後PBSで洗浄し、次にウェルにスキムミルク上清200μlずつ添加し、室温で3時間静置し、PBSで洗浄し、抗原固相化ウェルとする。

肝炎患者血清試料は500倍希釈、正常ヒト血清は100倍希釈を検体として用いた。それぞれの血清検体50μlずつを各ウェルに添加し、室温で3時間反応させた後PBSで洗浄する。次にウェルにHRP標識抗ヒトIgG抗体試薬(市販品)50μlをそれぞれ添加し、室温で1時間反応させた後PBSで洗浄する。このウェルに基質として過酸化水素含有o-フェニレンジアミン(OPD)溶液50μlずつを加え、室温で20分間反応させた後停止液として3N硫酸液100μlずつを加

える。490 nmの吸光度を測定した。得られた結果を表1に示す。

表1よりF型肝炎患者血清は、有意に高い吸光度を示し、その血清中にASXP蛋白に対する特異抗体が存在すると判断される。またASXP蛋白を構成するアミノ酸配列の一部からなるペプチド抗原は、F型肝炎感染の診断手段を提供する。正常ヒト血清の平均吸光度+2SDをカットオフ値とすれば、急性F型肝炎患者血清では少なくとも2例で、慢性F型肝炎患者血清では少なくとも10例で陽性が認められる。

表1

検体 番号	正常ヒト 血清	検体 番号	急性F型肝炎 患者血清	検体 番号	慢性F型肝炎 患者血清
1	0.063	11	0.078	25	0.239
2	0.071	12	0.028	26	0.078
3	0.057	13	0.067	27	0.070
4	0.060	14	0.059	28	0.093
5	0.057	15	0.037	29	0.140
6	0.085	16	0.073	30	0.073
7	0.022	17	0.050	31	0.156
7	0.024	18	0.047	32	0.120
9	0.032	19	0.091	33	0.073
10	0.025	20	0.090	34	0.062
		21	0.086	35	0.199
		22	0.053	36	0.242
		23	0.142	37	0.147
		24	0.143	38	0.132
				39	0.079
				40	0.098
				41	0.042
				42	0.091
				43	0.109
平均値	0.0496		0.0745		0.1178

発明の効果

HBVのX遺伝子の産物であるX蛋白は、HBVに感染したことを検出するための抗原としての有用性があるのみならず、正常肝細胞中で細胞因子との相互作用を介してHBV自身のエンハンサーあるいは他の細胞遺伝子のエンハンサーやプロモーター配列にトランスに作用し、転写を活性化することなどの知見が得られていることから、肝癌への関与が注目されている。本発明の新規なHBVのX領域由来のアンチセンス配列DNAでコードされるアミノ酸配列の全てあるいは一部を含むポリペプチドは、新規なHBVのX蛋白に特異的な領域に関連して存在しうるものと考えられ、これらのポリペプチド又はそれに対する特異抗体を用いた肝炎ウイルスに対する特異抗体検出系又は肝炎ウイルス検出系を開発すれば、既存の肝炎ウイルス感染検出診断方法で陰性として検出できなかった陽性とすべき患者を検出することが可能となる。本発明の新規なHBVのX領域由来のアンチセンス配列DNAでコードされるポリペプチド、その変異体、あるいはそれら配列の一部を含むポリペプチドは、診断剤又はそれらの開発用試薬として、さらには肝炎、肝癌、肝炎ウイルスなどの検出診断薬、予防治療剤などあるいはそれらの開発用試薬として有用である。また、これらの蛋白又はポリペプチド自体及びそれをコードする遺伝子を用い、転写活性検出系などを開発すれば、有効な抗ウイルス剤、抗腫瘍剤などの開発においても有用と考えられる。

既知のHBV DNAのX領域遺伝子のORFの8個の塩基配列が欠失しているため、アンチセンス配列上に161個のアミノ酸残基をコードするオープン・リーディング・フレーム（ORF）ができた。そしてこの遺伝子が実際に発現していると考えられる。この蛋白又はその一部配列からなるポリペプチドは、肝炎ウイルス、肝炎、肝癌などの腫瘍の診断剤、治療剤、予防剤又はそれらの開発用試薬として有望である。

配列表

配列番号：1

配列の長さ：3192

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直線状

配列の種類：Genomic DNA

アンチセンス：Yes

起源：Hepatitis B virus

直接の起源：既知の肝炎ウイルス検出診断方法で陰性の肝炎患者（E88HBV）血清

配列

CCACTGCATG GCCTGAGGAT GACTGTCTCT TAGAGGTGGA GAGATGGGAG TAGGCTGTCT	60
TCCTGACTGC CGATTGGTGG AGGCAGGAGG AGGCGCTGCT GGCCTGTTG TCAATATGCC	120
CTGAGCCTGA GGGCTCCACC CCAAAGACC GCCGTGTGGT GGGGTGAACC CTGGCCCGAA	180
TGCTCCCGCT CCTACCTGAT TTGCCTCTGG CCAGTGATCC TTGTTGGGGT TGAAGTCCCA	240
ATCTGGATTG TTTGAGTTGG CTCCGAACGC AGGGTCCAAC TGGTGATCGG GAAAGAATCC	300
CAGAGGATTG GGAACAGAAA GATTCGTCCC CATGCCTTGT CGAGGTTTGG TGCTGTAGCT	360
CTTGTTCCCA AGAATATGGT GACCCACAAA ATGAAGCGCT GCGTGTAGTT TCTCTTTTAT	420
ATAGAATGCC AGCCTTCCAC AGAGTATGTA AATAATGCCT AGTTTGAAG TAATGATTAA	480
CTGCATGTTT AGGATAATAA GGTTTAATGC CTTTATCCAA GGGCAAATAT TTGGTAAGGT	540
TAGGATAGAA CCTAGCAGGC ATAATTAATT TTAATCTCCT TTTTTCATTA ACTGTAAGAG	600
GGCCACATA TTGTTGACAT CTATTAATAA TGTCTTCCTG TAAATGAATG TGAGGAAAGG	660
AGGGCGGTG CCACTCGGGA TTAAAGACAG GTACAGTAGA AGAATAAAGC CCAGTAAAGT	720
TTCCACCTT ATGAGTCCAA GGGATACTAA CATTGAGATT CCCGAGATTG AGATCTTCTG	780
CGACGCGGCG ATTGAGACCT TCGTCTGCGA GGCGAGGGAG TTCTTCTTCT AGGGGACCTG	840
CCTCGTCGTC TAACAACAGT AGTTTCCGGA AGTGTGATA AGATAGGGGC ATTTGGTGGT	900
CTGTAAGCGG GAGGAGTGCC AATCCCACT CCAAAGACA CCAAATACTC CAAAACAGTT	960
TCTCTTCCAA AAGTAAGACA GGAAATGTGA AACCACAATA GTTGTCTGAT TTTTAGGCCC	1020
ATATTAACAT TGACATAGCT GACTACTAAT TCCCTGGATG CTGGGTCTTC CAAATTACTT	1080
CCCACCCAGG TGGCCAGATT CATCAACTCA CCCCAACACA GAATAGCTTG CCTGAGTGCT	1140
GTATGGTGAG GTGAACAATG TTCCGGAGAC TCTAAGGCCT CCCGATACAG AGCAGAGGCG	1200
GTGTCGAGGA GATCTCGAAT AGAAGGAAAG AAGTCAGAAG GCAAAAAGA GAGTAACTCC	1260
ACAGAAGCTC CAAATTCTTT ATACGGGTCA ATGTCCATGC CCCAAAGCCA CCCAAGGCAC	1320
AGCTTGGAGG CTTGAACAGT AGGACATGAA CATGAGATGA TTAGGCAGAG GTGAAAAAGT	1380
TGCATGGTGC TGGTGAACAG ACCAATTTAT GCCTACAGCC TCCAGACCTT TAACCTAATC	1440
TCCTCCCCCA ACTCCTCCCA GTCTTTAAAC AAACAGTCTT TGAAGTATGC CTCAAGGTCG	1500

GTCGTTGACA	TTGCTGAGAG	TCCAAGAGTC	CTCTTATGTA	AGACCTTGGG	CAAGACCTGG	1560
TGGGCGTTCA	CGGTGGTCTC	CATGCGACGT	GCAGAGGTGA	GGCGAAGTGC	ACACGGCTCG	1620
GCAGATGAGA	AGGCACAGAC	GGGAGACCG	CGTAAAGAGA	GGTGGCCCCC	GTGGTCGGCC	1680
GGAACGGCAG	ATGAAGAAGG	GGACGGTAGA	GGCCCAAACG	GCCCCGAGAC	GGGTGCTCCG	1740
CGGGATTGAG	CGCCGACGGG	ACGTAGACAA	AGGACGTCCC	GCGCAGGATC	CAGTTGGCAG	1800
CACACCCGAG	CAGCCATGGG	AAGGAGGTGT	ATTTCCGAGA	GAGGACAACA	GAGTTGTCCG	1860
TTCCGATAAG	TTTCGCTCCA	GACCGGCTGC	GAGCAAAACA	AGCTGCTAGG	AGTTCCGCAG	1920
TATGGATCGG	CAGAGGAGCC	ACAAAGGTTT	CACGCATGCG	GCGATGGCCA	ATAGCCAAGC	1980
CCCATCCAGT	GGGGGTTGCG	TCAGCAAACA	CTTGGCAGAG	ACCTGAACGT	TGCCGGGCAA	2040
CGGGGTAAAG	GTGCAGATAT	TGTTGACACA	GAAAGGCCTT	GTAAGTTGGC	GAGAAAGTGA	2100
AAGCCTGCTT	AGATTGTATA	CATGCATATA	AAGGCATCAA	TGCAGGATAG	CCACATTGTG	2160
TAAAAGGGGC	AGCAAAGCCC	AAAAGACCCA	CAATTCTTTG	ACATACTTTC	CAATCAATAG	2220
GTCTATTTAC	AGGCAGTTTC	CGAAAACATT	GTTTGAGTTT	TAATACAATA	TGTTCTGTG	2280
GTAAAGTACC	CCAACTTCCA	ATTACATATC	CCATGAAGTT	AAGGGAGTAG	CCCCAACGTT	2340
TGGTTTTATT	AGGGTTCAAA	TGTATACCCA	AAGACAAAAG	AAAATTGGTA	ATAGAGGTAA	2400
AAAGGGACTC	AAGATGTTGT	ACAGACTTGG	CCCCCAATAC	CACATCATCC	ATATAACTGA	2460
AAGCCAAACA	GTGGGGGAAA	GCCCTGCGAA	CCACTGAACA	AATGCCACTA	GTAAACTGAG	2520
CCAGGAGAAA	CGGACTGAGG	CCCACTCCCA	TAGGAATCTT	GCGAAAGCCC	AGGATGATGG	2580
GATGGGAATA	CAAGTGCAGT	TTCCGTCCGA	AGGTTTTGTA	CAGCAACAAG	AGGGAAACAT	2640
AGAGGTTCTT	TGAGCAGGAA	TCGTGCAGGT	CTTGCATGGT	CCCGTGCTGG	TAGTTGATGT	2700
TCCTGGAAGT	AGAGGACAAA	CGGGCAACAT	ACCTTGGTAG	TCCAGAAGAA	CCAACAAGAA	2760
GATGAGGCAT	AGCAGCAGGA	TGAAGAGGAA	TATGATAAAA	CGCCGCAGAC	ACATCCAGCG	2820
ATAGCCAGGA	CAAATTGGAG	GACAAGAGGT	TGGTGAGTGA	TTGGAGGTTG	GGGACTGCCA	2880
ATTTTGCCCA	GGACACGTGG	GTGCTTCCCC	TAGAAAATTG	AGAGAAGTCC	ACCACGAGTC	2940
TAGACTCTGT	GGTATTGTGA	GGATTCTTGT	CAACAAGAAA	AACCCCGCCT	GTAACACGAG	3000
CAGGGGTCCT	AGGAATCCTG	ATGTTGTGCT	CTCCATGTTC	GGTGCAGGGT	CCCCAGTCCT	3060
CGAGAAGATT	GACGATATGG	GTGAGACAAT	AGTCGGAACA	GGGTTTACTG	TTCCGGAAC	3120
GGAGCCACCA	GCAGGAAAAT	ATAGGCCCCCT	CACTCTGGGA	TCTAGCAGAG	CTTGGTGGAA	3180
TGTTGTGGAG	TT					3192

配列番号 : 2

配列の長さ : 3 2 0 7

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 両形態

トポロジー : 直線状

配列の種類 : Genomic DNA

アンチセンス: Yes

起源: Hepatitis B virus

直接の起源: 既知の肝炎ウイルス検出診断方法で陰性の肝炎患者 (H2HBV)

血清

配列

CCACTGCATG GCCTGAGGAT GACTGTCTCT TAGAGGTGGA GAGATGGGAG TAGGCTGTCT	60
TCCTGACTGC CGATTGGTGG AGGCAGGAGG AGGCGTTGCT GGCACTGTTG TCAATATGCC	120
CTGAGCCTGA GGGCTCCACC CAAAAGACC GCCGTGTGGT GGGGTGAACC CTGGCCCGAA	180
TGCTCCCGCT CCTACCTGAT TTGCCTCTGG CCAGTGATCC TTGTTGGGGT TGAAGTCCCA	240
ATCTGGATTG TTTGAGTTGG CTCCGAACGC AGGGTCCAAC TGGTGATCGG GAAAGAATCC	300
CAGAGGATTG GGAACCGAAA GATTCGTCCC CATGCCTTGT CGAGGTTTGG AAGACCAACC	360
TCCATGCTG TAGCTCTTGT TCCCAAGAAT ATGGTGACCC ACAAATGAA GCGTGCGTG	420
TAGTTTCTCT TTTATATAGA ATGCCCCGCT TCCACAGAGT ATGTAAATAA TGCCTAGTTT	480
TGAAGTAATG ATTAAGTGA TGTTCAGGAT AATATGGTTT AATGCCTTTG TCCAATGGCA	540
AATATTTGGT AAGGTTAGGA TAGAACCTAG CAGGCATAAT TAATTTTAAT CTTCTTTTTT	600
CATTAACTGT AAGAGGGCCC ACATATTGTT GACATCTATT AATAATGTCT TCCTGTAAAT	660
GAATGTTAGG AAAGGAGGGA GTTTGCCACT CAGGATTAAG GACAGGTACA GTAGAAGAAT	720
AAAGCCCAGT AAAGTTTCCC ACCTTATGAG TCCAAGGGAT ACTAACATTG AGATTCCCGA	780
GATTGAGATC TTCTGCGACG CGGCGATTGA GACCTTCGTC TGCGAGGCGA GGGAGTTCTT	840
CTTCTAGGGG ACCTGCCTCG TCGTCTAACA ACAGTAGTTT CCGGAAGTGT TGATAAGATA	900
GGGGCATTTG GTGGTCTGTA AGCGGGAGGA GTGCGAATCC ACACTCCAAA AGATACCAA	960
TACTCCAAAA CAGTTTCTCT TCCAAAAGTA AGACAGGAAA TGTGAAACCA CAATAGTTGT	1020
CGGATTTTGA GGCCCATATT AACATTGACA TAGCTGACTA CTAATTCCTT GGATGCTGGG	1080
TCTTCCAAAT TACTTCCCAC CCAGGTGGCC AGATTCTATCA ACTCACCCCA ACACAGAATA	1140
GCTTGCCCTGA GTGCTGTATG GTGAGGTGAA CAATGTTCCG GAGACTCTAA GGCCTCCCGA	1200
TACAGAGCAG AGGCGGTGTC GAGGAGATCT CGAATAGAAG GAAAGAAGTC AGAAGGCAAA	1260
AAAGAGAGTA ACTCCACAGA AGCTCCAAAT TCTTTATATG GGTCAATGTC CATGCCCCAA	1320
AGCCACCCAA GGCACAGCTT GGAGGCTTGA ACAGTAGGAC ATGAACATGA GATGATTAGG	1380
CAGAGGTGAA AAAGTTGCAT GGTGCTGGTG AACAGACCAA TTTATGCCTA CAGCCTCCAG	1440
ACCTTTAACC TAATCTCCTC CCCCAACTCC TCCCAGTCCT TAAACAAACA GTCTTTGAAG	1500
TATGCCTCAA GGTCGGTCGT TGACATTGCT GAGAGTCCAA GAGTCCTCTT ATGTAAGACC	1560
TTGGGCAAGA CCTGGTGGG GTTCACGGTG GTCTCCATGC GACGTGCAGA GGTGAGGCGA	1620
ACTGCACACG GTACGGCAGA TGAGAAGGCA CAGACGGGGA GAGCGGGTAA AGAGAGGTGC	1680
GCCCGGTGGT CGGCCGGAAC GGCAGATGAA GAAGGGGACG GTAGAGGCCA AAACGGCCCC	1740
GAGACGGGTC GTCGGCGGGA TTCAGCGCCG ACGGGACGTA GACAAAGGAC GTCCCGCGCA	1800
GGATCCAGTT GGCAGCACAC CCGAGCAGCC ATGGAAAGGA GGTGTATTTC CGAGAGAGGA	1860
CAACAGAGTT GTCAGTCCCG ATAAGTTTGT CTCCAGACCG GCTGCGAGCA AAACACGCTG	1920

CTAGGAGTTC CGCAGTATGG ATCGGCAGAG GAGCCACAAA GGTTCACGC ATGCGCCGAT	1980
GGCCTATGGC CAAGCCCCAT CCAGTGGGGG TTGCGTCAGC AAACACTTGG CAGAGACCTG	2040
AACGTTGCCG GGCAACGGGG TAAAGGTGCA GATATTGTTG ACACAGAAAG GCCTTGTAAG	2100
TTGGCGAGAA AGTGAAAGCC TGCTTAGATT GTATACATGC ATATAAAGGC ATCAATGCAG	2160
GATAGCCACA TTGTGTAAAA GGGGCAGCAA AGCCCAAAAG ACCCACAATT CTTTGACATA	2220
CTTTCCAATC AATAGGTCTA TTTACAGGCA GTTTCCGAAA ACATTGTTTG AGTTTTAATA	2280
CAATATGTTT CTGTGGTAAA GTACCCCAAC TTCCAATTAC ATATCCCATG AAGTTAAGGG	2340
AGTAGCCCCA ACGTTTGGTT TTATTAGGGT TCAAATGTAT ACCCAAAGAC AAAAGAAAAT	2400
TGGAATAGA GGTAAAAAGG GACTCAAGAT GTTGACAGA CTTGGCCCCC AATACCACAT	2460
CATCCATATA ACTGAAAGCC AAACAGTGGG GGAAAGCCCT GCGAACCCT GAACAAATGG	2520
CACTAGTAAA CTGAGCCAGG AGAAACGGAC TGAGGCCAC TCCCATAGGA ATCTTGCGAA	2580
AGCCCAGGAT GATGGGATGG GAATACAAGT GCAGTTTCCG TCCGAAGGTT TTGTACAGCA	2640
ACAAGAGGGA AACATAGAGG TTCCTTGAGC AGGAATCGTG CAGGTCTTGC ATGGTCCCGT	2700
GCTGGTAGTT GATGTTCTCG GAAGTAGAGG ACAAACGGGC AACATACCTT GGTAGTCCAG	2760
AAGAACCAAC AAGAAGATGA GGCATAGCAG CAGGATGAAG AGGAATATGA TAAACGCCC	2820
CAGACACATC CAGCGATAGC CAGGACAAAT TGGAGGACAA GAGGTTGGTG AGTGATTGGA	2880
GGTTGGGGAC TGCGAATTTT GGCCAGGACA CGTGGGTGCT TCCCCTAGAA AATTGAGAGA	2940
AGTCCACCAC GAGTCTAGAC TCTGTGGTAT TGTGAGGATT CTTGTCAACA AGAAAAACCC	3000
CGCCTGTAAC ACGAGCAGGG GTCCTAGGAA TCCTGATGTT GTGCTCTCCA TGTTCGGTGC	3060
AGGGTCCCCA GTCCTCGAGA AGATTGACGA TATGGGTGAG GCAGTAGTCG GAACAGGGTT	3120
TACTGTTCCG GAACTGGAGC CACCAGCAGG AAAATATAGG CCCCTCACTC TGGGATCTAG	3180
CAGAGCTTGG TGGAATGTTG TGGAATT	3207

配列番号 : 3

配列の長さ : 1 6 1

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直線状

配列の種類 : ペプチド

ハイボセティカル : Yes

起源 : Hepatitis B virus

直接の起源 : 既知の肝炎ウイルス検出診断方法で陰性の肝炎患者 (E 8 8 H B V)
血清

配列の特徴

特徴を示す記号 : peptide

存在位置 : 1 3 8 4 . . 1 8 6 9

特徴を決定した方法 : P

4 4

配列

Met Val Leu Val Asn Arg Pro Ile Tyr Ala Tyr Ser Leu Gln Thr Phe
 1 5 10 15
 Asn Leu Ile Ser Ser Pro Asn Ser Ser Gln Ser Leu Asn Lys Gln Ser
 20 25 30
 Leu Lys Tyr Ala Ser Arg Ser Val Val Asp Ile Ala Glu Ser Pro Arg
 35 40 45
 Val Leu Leu Cys Lys Thr Leu Gly Lys Thr Trp Trp Ala Phe Thr Val
 50 55 60
 Val Ser Met Arg Arg Ala Glu Val Arg Arg Ser Ala His Gly Ser Ala
 65 70 75 80
 Asp Glu Lys Ala Gln Thr Gly Arg Pro Arg Lys Glu Arg Cys Ala Pro
 85 90 95
 Trp Ser Ala Gly Thr Ala Asp Glu Glu Gly Asp Gly Arg Gly Pro Asn
 100 105 110
 Gly Pro Glu Thr Gly Arg Pro Arg Asp Ser Ala Pro Thr Gly Arg Arg
 115 120 125
 Gln Arg Thr Ser Arg Ala Gly Ser Ser Trp Gln His Thr Arg Ala Ala
 130 135 140
 Met Gly Arg Arg Cys Ile Ser Glu Arg Gly Gln Gln Ser Cys Arg Phe
 145 150 155 160
 Arg
 161

配列番号 : 4

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直線状

配列の種類 : 他の核酸

配列

GACTGGGAGG AGTTGGGGGA

20

配列番号 : 5

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー：直線状
配列の種類：他の核酸 合成DNA
配列
GGATTAAAGA CAGGTACAGT

20

配列番号：6
配列の長さ：20
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直線状
配列の種類：他の核酸 合成DNA
配列
AGGCAGGTCC CCTAGAAGAA

20

配列番号：7
配列の長さ：20
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直線状
配列の種類：他の核酸 合成DNA
配列
GGTTGAAGT CCCAATCTGG

20

配列番号：8
配列の長さ：20
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直線状
配列の種類：他の核酸 合成DNA
配列
GGCATTAAAC CTTATTATCC

20

配列番号：9
配列の長さ：20
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TGGAGGACAA GAGGTTGGTG

20

配列番号：10

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCATATCGTC AATCTCCTCG

20

配列番号：11

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AAGACCCACA ATTCTTTGAC

20

配列番号：12

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATGTGGTATT GGGGGCCAAG

20

配列番号：13

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GGTCGTCCGC GGGATTACGC

20

配列番号：14

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCATACTGCG GAACTCCTAG

20

配列番号：15

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATTAGGCAGA GGTGAAAAAG

20

配列番号：16

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GGAGATTAGG TTAAAGGTCT

20

配列番号：17

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AGACAGGTAC AGTAGAAGAA

20

配列番号 : 1 8

配列の長さ : 2 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直線状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

AGAACTCCCT CGCCTCGCAG

20

配列番号 : 1 9

配列の長さ : 2 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直線状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

AGGGTCCAAC TGGTGATCGG

20

配列番号 : 2 0

配列の長さ : 2 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直線状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

ATATAAGAGA GAAACTACAC

20

配列番号 : 2 1

配列の長さ : 2 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直線状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

AAACCCCGCC TGTAACACGA

20

配列番号：22
配列の長さ：20
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直線状
配列の種類：他の核酸 合成DNA
配列
CTCCTCGAGG ACTGGGACC

20

配列番号：23
配列の長さ：20
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直線状
配列の種類：他の核酸 合成DNA
配列
ACATACTTTC CAATCAATAG

20

配列番号：24
配列の長さ：20
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直線状
配列の種類：他の核酸 合成DNA
配列
CTGTACAACA TCTTGAGTCC

20

配列番号：25
配列の長さ：20
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直線状
配列の種類：他の核酸 合成DNA
配列
CCGACGGGAC GTAGACAAAG

20

5 0

配列番号：26

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TTTGCTCGC AGCCGGTCTG

20

配列番号：27

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATTAGGCAGA GGTGAAAAG

20

配列番号：28

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TTGCCTTCTG ACTTCTTTCC

20

配列番号：29

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TTTAATCCTG AATGGCAAAC

20

配列番号：30

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTCAAACAAT CCACATTGGG

20

配列番号：31

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TGTGTCTGCG GCGTTTATC

20

配列番号：32

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTATTGATTG GAAAGTATGT

20

配列番号：33

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTGCCGTTCC GGCCGACCAC

20

配列番号 : 3 4

配列の長さ : 3 1 9 2

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 両形態

トポロジー : 直線状

配列の種類 : Genomic DNA

起源 : Hepatitis B virus

直接の起源 : 既知の肝炎ウイルス検出診断方法で陰性の肝炎患者 (E 8 8 H B V) 血清

配列

AACTCCACAA CATTCCACCA AGCTCTGCTA GATCCCAGAG TGAGGGGCCT ATATTTTCCT	60
GCTGGTGGCT CCAGTTCGG AACAGTAAAC CCTGTTCCGA CTATTGTCTC ACCCATATCG	120
TCAATCTTCT CGAGGACTGG GGACCCTGCA CCGAACATGG AGAGCACAAC ATCAGGATTC	180
CTAGGACCCC TGCTCGTGTT ACAGGCGGGG TTTTCTTGT TGACAAGAAT CCTCACATA	240
CCACAGAGTC TAGACTCGTG GTGGACTTCT CTCAATTTTC TAGGGGAAGC ACCCAGTGT	300
CCTGGCCAAA ATTGCAGTC CCCAACCTCC AATCACTCAC CAACCTCTTG TCCTCCAATT	360
TGTCCTGGCT ATCGCTGGAT GTGTCTGGG CGTTTTATCA TATTCCTCTT CATCTGCTG	420
CTATGCCTCA TCTTCTTGTT GGTCTTCTG GACTACCAAG GTATGTTGCC CGTTTGTCTT	480
CTACTTCCAG GAACATCAAC TACCAGCAGC GGACCATGCA AGACCTGCAC GATTCCTGCT	540
CAAGGAACCT CTATGTTTCC CTCTTGTTGC TGTACAAAAC CTTCGGACGG AAAGTCACT	600
TGTATTCCCA TCCCATCATC CTGGGCTTTC GCAAGATTCC TATGGGAGTG GGCCTCAGTC	660
CGTTTCTCCT GGCTCAGTTT ACTAGTGCCA TTTGTTCACT GGTTCGCAGG GCTTTCCCCC	720
ACTGTTTGGC TTTCAGTTAT ATGGATGATG TGGTATTGGG GGCCAAGTCT GTACAACATC	780
TTGAGTCCCT TTTTACCTCT ATTACCAATT TTCTTTTGTG TTTGGGTATA CATTTGAACC	840
CTAATAAAAC CAAACGTTGG GGCTACTCCC TTAACCTCAT GGGATATGTA ATTGGAAGTT	900
GGGTACTTTT ACCACAGGAA CATATTGTAT TAAACTCAA ACAATGTTTT CGGAAACTGC	960
CTGTAAATAG ACCTATTGAT TGGAAAGTAT GTCAAAGAAT TGTGGGTCTT TTGGGCTTTG	1020
CTGCCCCTTT TACACAATGT GGCTATCCTG CATTGATGCC TTTATATGCA TGTATACAAT	1080
CTAAGCAGGC TTTCACTTTC TCGCCAACCT ACAAGGCCTT TCTGTGTCAA CAATATCTGC	1140
ACCTTTACCC CGTTGCCCCG CAACGTTTCA GTCTCTGCCA AGTGTGTTGCT GACGCAACCC	1200
CCACTGGATG GGGCTTGGCT ATTGGCCATC GCCGCATGCG TGGAACCTTT GTGGCTCCTC	1260
TGCCGATCCA TACTGCGGAA CTCCTAGCAG CTTGTTTTGC TCGCAGCCGG TCTGGAGCGA	1320
AACTTATCGG AACCGACAAC TCTGTTGTCC TCTCTCGGAA ATACACCTCC TTCCCATGGC	1380
TGCTCGGGTG TGCTGCCAAC TGGATCCTGC GCGGGACGTC CTTTGTCTAC GTCCCGTCGG	1440
CGCTGAATCC CGCGGACGAC CCGTCTCGGG GCCGTTTGGG CCTCTACCGT CCCCTTCTTC	1500
ATCTGCCGTT CCGGCCGACC ACGGGGCGCA CCTCTCTTTA CGCGGTCTCC CCGTCTGTGC	1560
CTTCTCATCT GCCGAGCCGT GTGCACTTCG CCTCACCTCT GCACGTCGCA TGGAGACCAC	1620

5 3

CCTGAACGCC CACCAGGTCT TGCCCAAGGT CTTACATAAG AGGACTCTTG GACTCTCAGC	1680
AATGTCAACG ACCGACCTTG AGGCATACTT CAAAGACTGT TTGTTTAAAG ACTGGGAGGA	1740
GTTGGGGGAG GAGATTAGGT TAAAGGTCTG GAGGCTGTAG GCATAAATTG GTCTGTTTAC	1800
CAGCACCATG CAACTTTTTC ACCTCTGCCT AATCATCTCA TGTTTCATGTC CTA CTGTTTCA	1860
AGCCTCCAAG CTGTGCCTTG GGTGGCTTTG GGCATGGAC ATTGACCCGT ATAAAGAATT	1920
TGGAGCTTCT GTGGAGTTAC TCTCTTTTTT GCCTTCTGAC TTCTTTCCTT CTATTCGAGA	1980
TCTCCTCGAC ACCGCCTCTG CTCTGTATCG GGAGGCCTTA GAGTCTCCGG AACATTGTTT	2040
ACCTCACCAT ACAGCACTCA GGCAAGCTAT TCTGTGTTGG GGTGAGTTGA TGAATCTGGC	2100
CACCTGGGTG GGAAGTAATT TGGAAGACCC AGCATCCAGG GAATTAGTAG TCAGCTATGT	2160
CAATGTTAAT ATGGGCCTAA AAATCAGACA ACTATTGTGG TTTCACATTT CCTGTCTTAC	2220
TTTTGGAAGA GAAACTGTTT TGGAGTATTT GGTGTCTTTT GGAGTGTTGA TTGGCACTCC	2280
TCCCGCTTAC AGACCACCAA ATGCCCTAT CTTATCAACA CTTCCGAAA CTA CTGTTTGT	2340
TAGACGACGA GGCAGGTCCC CTAGAAGAAG AACTCCCTCG CCTCGCAGAC GAAGGTCTCA	2400
ATCGCCGCGT CGCAGAAGAT CTCAATCTCG GGAATCTCAA TGTTAGTATC CCTTGGACTC	2460
ATAAGTGGG AAACCTTACT GGGCTTTATT CTTCTACTGT ACCTGTCTTT AATCCCGAGT	2520
GGCAACCGCC CTCCTTTCCT CACATTCATT TACAGGAAGA CATTATTAAT AGATGTCAAC	2580
AATATGTGGG CCCTCTTACA GTTAATGAAA AAAGGAGATT AAAATTAATT ATGCCTGCTA	2640
GGTTCTATCC TAACCTTACC AAATATTTGC CCTTGGATAA AGGCATTAAA CCTTATTATC	2700
CTGAACATGC AGTTAATCAT TACTTCAAAA CTAGGCATTA TTTACATACT CTGTGGAAGG	2760
CTGGCATTCT ATATAAAAGA GAACTACAC GCAGCGCTTC ATTTTGTGGG TCACCATATT	2820
CTTGGGAACA AGAGCTACAG CACCAAACCT CGACAAGGCA TGGGGACGAA TCTTTCTGTT	2880
CCCAATCCTC TGGGATTCTT TCCCGATCAC CAGTTGGACC CTGCGTTCGG AGCCAACTCA	2940
AACAATCCAG ATTGGGACTT CAACCCCAAC AAGGATCACT GGCCAGAGGC AAATCAGGTA	3000
GGAGCGGGAG CATTCGGGCC AGGGTTCACC CCACCACAG GCGGTCTTTT GGGGTGGAGC	3060
CCTCAGGCTC AGGGCATATT GACAACAGTG CCAGCAGCGC CTCCTCCTGC CTCCACCAAT	3120
CGGCAGTCAG GAAGACAGCC TACTCCCATC TCTCCACCTC TAAGAGACAG TCATCCTCAG	3180
GCCATGCAGT GG	3192

配列番号 : 3 5

配列の長さ : 2 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直線状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

.ATGGTGCTGG TGAACAGACC

5 4

配列番号 : 3 6

配列の長さ : 2 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直線状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

TCGGAACCGA CAACTCTGTT

20

配列番号 : 3 7

配列の長さ : 3 2

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直線状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

TAGTACAAGC TTTTATCGGA ACCGACAACT CT

32

配列番号 : 3 8

配列の長さ : 3 2

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直線状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

TAGTACGCAT GCATGGTGCT GGTGAACAGA CC

32

配列番号 : 3 9

配列の長さ : 3 2

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直線状

配列の種類 : ペプチド

配列

Val Ser Met Arg Arg Ala Glu Val Arg Arg Ser Ala His Gly Ser Ala

1

5

10

15

Asp Glu Lys Ala Gln Thr Gly Arg Pro Arg Lys Glu Arg Cys Ala Pro

20

25

30

5 5

配列番号：4 0

配列の長さ：2 3

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直線状

配列の種類：ペプチド

配列

Gly Pro Glu Thr Gly Arg Pro Arg Asp Ser Ala Pro Thr Gly Arg Arg

1

5

10

15

Gln Arg Thr Ser Arg Ala Gly

20

配列番号：4 1

配列の長さ：1 4

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直線状

配列の種類：ペプチド

配列

Ser Met Arg Arg Ala Glu Val Arg Arg Ser Ala His Gly Ser

1

5

10

配列番号：4 2

配列の長さ：2 4

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直線状

配列の種類：ペプチド

配列

Pro Arg Lys Glu Arg Cys Ala Pro Trp Ser Ala Gly Thr Ala Asp Glu

1

5

10

15

Glu Gly Asp Gly Arg Gly Pro Asn

20

請求の範囲

1. 少なくとも配列表の配列番号3で示されるアミノ酸配列又はそれと実質的に同等の作用を有するアミノ酸配列あるいはその断片をコードするDNAを含有することを特徴とするHBVのX領域由来の遺伝子のアンチセンス配列DNA。
5
2. 配列表の配列番号1で示されるDNA配列又はそれと実質的に同等の作用を有するDNA配列の全部またはその一部からなる請求項1記載のDNA。
3. 配列表の配列番号1で示されるDNA配列の全部またはその一部からなる請求項1又は2記載のDNA。
10
4. 配列表の配列番号1で示されるDNA配列のうち、第1384番目から第1869番目までの配列の全部またはその一部からなる請求項1～3のいずれか一記載のDNA。
5. 配列表の配列番号2で示されるDNA配列又はそれと実質的に同等の作用を有するDNA配列の全部またはその一部からなる請求項1記載のDNA。
15
6. 配列表の配列番号2で示されるDNA配列の全部またはその一部からなる請求項1又は2記載のDNA。
7. 請求項1～6のいずれか一記載のDNAを遺伝子組換え操作可能に含むことを特徴とするクローニングまたは発現ベクター。
20
8. 請求項7記載のクローニングまたは発現ベクターで形質転換されたことを特徴とする宿主細胞。
9. 配列表の配列番号3で示されるアミノ酸配列又はそれと実質的に同等の作用を有するアミノ酸配列の全部またはその一部からなることを特徴とするHBVのX領域由来の遺伝子のアンチセンス配列由来のポリ
25

ペプチド。

10. 配列表の配列番号3で示されるアミノ酸配列の全部またはその一部からなるところの請求項9記載のHBVのX領域由来の遺伝子のアンチセンス配列由来のポリペプチド。

5 11. 請求項9又は10記載のポリペプチドを含有することを特徴とするHBV測定試薬。

12. 請求項9又は10記載のポリペプチドに対する特異抗体を含有することを特徴とするHBV測定試薬。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/00700

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1⁶ C12N15/51, C07K14/02, G01N33/569

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1⁶ C12N15/51

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE, WPI/L, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 94/29483, A (UINV. JEFFERSON THOMAS), December 22, 1994 (22. 12. 94) & US, 5378605, A	1 - 12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
June 12, 1995 (12. 06. 95)Date of mailing of the international search report
July 4, 1995 (04. 07. 95)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N15/51, C07K14/02, G01N33/569

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N15/51

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE, WPI/L, BIOSIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 94/29483, A (UNIV. JEFFERSON THOMAS), 22. 12月. 1994 (22. 12. 94) &US, 5378605, A	1-12

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日
若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献
(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日
の後に公表された文献「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と
矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため
に引用するもの「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規
性又は進歩性がないと考えられるもの「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文
献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性
がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12. 06. 95

国際調査報告の発送日

04.07.95

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 明 照

4B

8412

電話番号 03-3581-1101 内線 3448